

4 Strukturanalyse der offenen Konformation

4.1 Strukturlösung der Kristallform II mit Wolframat

4.1.1 Messung der MAD-Daten

Röntgenstrahlung besitzt eine hohe Energie, die neben der kristallspezifischen Diffraktion auch zu Ionisierung und Radikalbildung im Kristall führt. Die Radikale reagieren mit den Proteinkomplexen und stören deren periodische Anordnung im Kristall, so daß die Beugungsqualität der Kristalle abnimmt. Um die Diffusion der gebildeten Radikale und die Reaktionsgeschwindigkeit der Sekundärreaktionen im Kristall zu vermindern, werden Beugungsdaten von Proteinkristallen seit einigen Jahren überwiegend an gefrorenen Kristallen bei 100 K gemessen. Wesentlich für das erfolgreiche Einfrieren von Proteinkristallen ist die Verwendung eines geeigneten Gefrierschutzmittels bzw. Tieftemperaturpuffers. Da die meisten Proteinkristalle einen Solvensanteil zwischen 40 und 60 % haben und sich beim Einfrieren bildende Eiskristalle den Aufbau des Proteinkristalls zerstören, ist ein teilweiser Austausch des Wassers im Inneren des Kristalls und an seiner Oberfläche gegen ein Gefrierschutzmittel notwendig. Das Einfrieren verursacht aufgrund der geringeren thermischen Bewegung der Moleküle meist eine leichte Verkleinerung der kristallographischen Elementarzelle. Dabei werden die Achsen oft unterschiedlich beeinflusst. Im vorliegenden Fall verkürzte sich die c-Achse um etwa 2 Å, während die a-, b-Achsen fast konstant blieben.

Die Datensammlung erfolgte an der Beamline BM14 am ESRF in Grenoble. Zur Datensammlung bei 100 K wurde der Kristall vor dem Schockfrieren in einen Tieftemperaturpuffer bestehend aus 30 % (v/v) Glycerin, 30 % (v/v) MPEG 550, 0.1 M MES pH 6.5, 15 mM ZnSO₄ und 2 mM Na₂WO₄ überführt. Die Überführung des Kristalle in den Tieftemperaturpuffer hatte eine geringere Auflösung zur Folge. Datensätze bei Raumtemperatur konnten bis zu Auflösung von 2.2 Å an der instituteigenen Röntgenanlage gemessen werden, während die in den Tieftemperaturpuffer überführten Kristalle nach dem Schockfrieren am Synchrotron lediglich eine Auflösung von 2.8 Å aufwiesen. Spätere Untersuchungen zeigten eine Abnahme der Auflösung, sobald die Konzentration von MPEG 550 mehr als 20 % betrug. Dies wurde aber zum Zeitpunkt der MAD-Messung noch nicht erkannt, so daß die Messung nur Daten bis zu einer Auflösung von 2.8 Å lieferte. Die 5'-NT kristallisiert unter den genannten Bedingungen in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁. Die Laue-Symmetrie wurde mit der Auswertungssoftware DENZO und SCALEPACK ermittelt und mit den Statistiken für R_{sym}

überprüft. Die Zuordnung der Schraubenachsen erfolgte durch die Auswertung der Auslöschungen entlang $h00$, $0k0$ und $00l$.

Da die orthorhombische Kristallform II der 5'-NT nur in Gegenwart von Zn^{2+} und WO_4^{2-} wächst, wurden in der Hoffnung, daß das Enzym Bindungsstellen für Zink und Wolframat enthält und eine Phasenbestimmung mittels multipler anomaler Dispersion möglich ist, Fluoreszenzspektren an einem orthorhombischen Kristall an der Wolfram- und Zinkkante aufgenommen (Abbildung 8). Die Fluoreszenz steht in Bezug zu f'' und ist über einen kleinen Energiebereich nahezu proportional zu f'' des untersuchten Schweratoms.

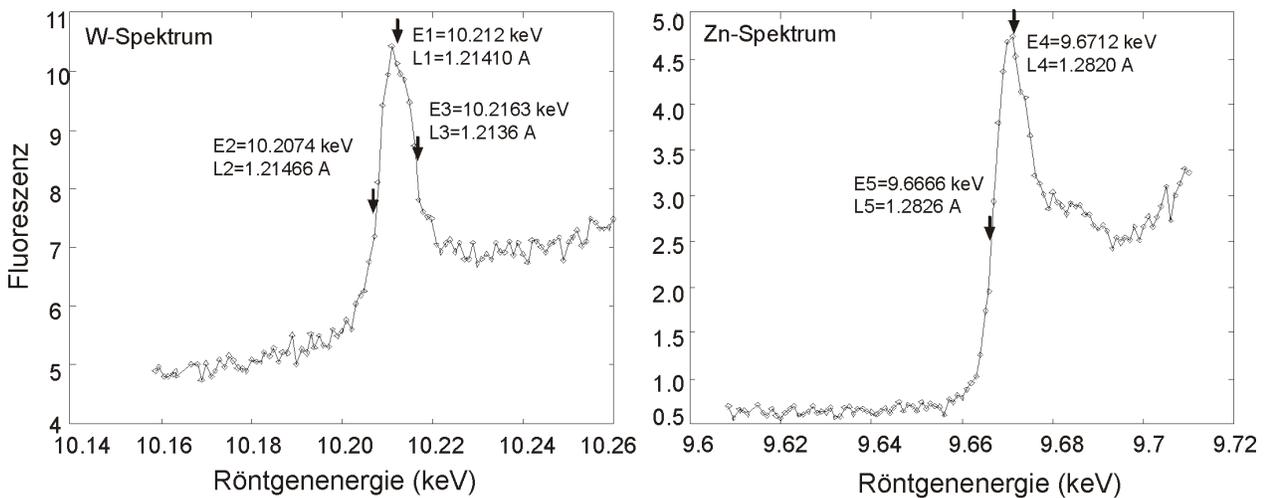


Abbildung 8: Fluoreszenzspektrum eines Kristalls der Kristallform II der 5'-NT an der Wolframkante (links) und der Zinkkante (rechts). Die zur MAD-Datenaufnahme verwendeten Wellenlängen sind markiert.

Es wurden Datensätze an drei Wellenlängen der Wolframkante (L1, L2 und L3) und an zwei Wellenlängen der Zinkkante gesammelt (L4 und L5), die aus den Fluoreszenzspektren entnommen wurden (Abbildung 8). L1 und L4 entsprechen dabei dem Maximum von f'' des Wolframs bzw. dem Maximum von f'' des Zinks. Auch das Minimum von f' des Wolframs (Wolframkante) bzw. das des Zinks (Zinkkante) kann aus den Fluoreszenzspektren entnommen werden (L2 und L5). Als weitere Wellenlänge wurde L3 an der abfallenden Schulter der Wolframkante gewählt. Hier besitzt f' von Wolfram ein lokales Maximum.

4.1.2 Messung der MIRAS-Daten

Zur Strukturlösung nach der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes plus anomaler Streuung (MIRAS) wurden Kristalle der orthorhombischen Kristallform II mit schweratomhaltigen Lösungen inkubiert und an der institutseigenen Röntgenanlage bei Raumtemperatur vermessen.

Der Großteil dieser Messungen wurde vor der MAD-Datenaufnahme durchgeführt. Es wurde auf die Anbindung von Ethylquecksilberthiosalicylat (EMTS), Hg_2Ac_2 , HgAc_2 , K_2PtCl_4 , Tertrakis(acetoxymmercuri)-Methan (TAMM), $\text{KAu}(\text{CN})_2$, UO_2Ac_2 , Na_2PtI_6 , Di- μ -Iodobis(ethylendiamin)-di-Platin(II)nitrat (PIP), EuCl_3 , ErCl_3 und SmCl_3 getestet (vgl. Tabelle 5). Weiterhin wurde durch Inkubation der Kristalle mit Wolframat-freiem Puffer versucht, Wolframat aus der Wolframat-bindungsstelle zu entfernen. Alle so inkubierten Kristalle beugten die Röntgenstrahlen bis zu einem Auflösungsbereich von 2.5 bis 2.8 Å.

Um den Inhalt der Elementarzelle zu ermitteln wurde der Matthews Koeffizient V_m (Matthews, 1968) berechnet. Der Quotient aus Zellvolumen und Molmasse des Proteins in der Zelle beträgt $V_m = V / (M Z n) = 6.3 / n \text{ \AA}^3 / D$. n ist dabei die Anzahl von Monomeren in der asymmetrischen Einheit, Z die Anzahl von asymmetrischen Einheiten pro Zelle und V das Zellvolumen. Unter der Annahme, daß der Solvensgehalt im Bereich zwischen 30 und 65% liegt (also V_m zwischen 1.9 und 3.9 Å³/D), liegen in der orthorhombischen Kristallform II zwei Monomere ($V_m = 3.1 \text{ \AA}^3/D$) in der asymmetrischen Einheit vor. Der Solvensgehalt liegt somit bei etwa 60 % (berechnet mit einer Proteindichte von 1.23 g/ml).

4.1.3 Phasenbestimmung

Eine Lösung des Phasenproblems konnte durch eine Kombination der multiplen anomalen Dispersion in Verbindung mit der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes plus anomale Streuung erzielt werden. Dazu wurden die Phasen, die aus den MAD-Daten berechnet wurden mit denen aus den MIRAS-Daten kombiniert. Die MAD- und MIRAS-Phasen wurden aufgrund der Nicht-Isomorphie der bei Tieftemperatur gemessenen MAD-Daten und der bei Raumtemperatur gemessenen MIRAS-Daten über eine Mittelung der Elektronendichtekarten mit dem Programm DMMULTI (Cowtan, 1994) kombiniert und verfeinert. Tabelle 7 zeigt die kristallographische Datenstatistik der für die Phasenberechnung gemessenen Kristalle der orthorhombischen Kristallform II.

Die Datensätze NATO, PIP und SmCl_3 sind von an der institutseigenen Röntgenanlage bei Raumtemperatur gemessenen Kristallen, die zur MIRAS-Phasenberechnung verwendet wurden, während L1 bis L5 die Datensätze darstellen, die am ESRF in Grenoble bei 100 K an einem Kristall an unterschiedlichen Wellenlängen gemessen wurden (MAD-Daten). Die geringe Vollständigkeit der Datensätze L1 bis L3 ist auf einen Fehler bei der Berechnung des zu

vermessenden Rotationsbereichs zurückzuführen. Dies wurde erst nach der Aufnahme von Datensatz L3 bemerkt und für L4 und L5 korrigiert.

Tabelle 7: Kristallographische Datenstatistik der für die MAD- und MIRAS-Phasenberechnung gemessenen orthorhombischen Kristalle II (Raumgruppe $P2_12_12_1$).

Datensammlung	II-NAT	II-PIP	II-SM	II-L1	II-L2	II-L3	II-L4	II-L5
Temperatur (K)	298	298	298	100	100	100	100	100
Wellenlänge (Å)	1.5418	1.5418	1.5418	1.2141 f ⁺ max W	1.2147 f ⁻ min W	1.2136 re. Schulter	1.2820 f ⁺ max Zn	1.2826 f ⁻ min Zn
Auflösung max. (Å)	2.2	2.5	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Gemessene Reflexe	196559	138968	99318	98175	99396	99349	150860	151763
Unabhängige Reflexe	70373	48205	35456	44278	44362	44358	59207	59216
Vollständigkeit (%)	98.4	98.6	98.5	73.5	73.7	73.7	98.3	98.3
R _{sym} (%) ^a	6.8	9.6	6.9	4.3	4.4	4.5	5.6	5.3
R _{iso} (%) ^b	21.8		18.9					
R _{ano} (%) ^c			6.8	7.4	5.0	5.9	5.5	3.9
Phasierung bis 2.8 Å								
Bindungsstellen	2		1	4	4	4	4	4
Phasing Power ^d	1.0		1.1	2.6 / 2.9	2.7 / 2.6	2.8 / 3.0	1.6 / 2.6	1.7 / 0.0

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$$

$$^b R_{\text{iso}} = \frac{\sum |F_{\text{ph}}^2 - F_{\text{p}}^2|}{\sum (F_{\text{ph}}^2 + F_{\text{p}}^2)}$$

$$^c R_{\text{ano}} = \frac{\sum |F_{(+)}^2 - F_{(-)}^2|}{\sum (F_{(+)}^2 + F_{(-)}^2)}$$

^dPhasing Power = rms $F_{\text{H}}/E_{\text{iso}}$, der quadratische Mittelwert der Schweratom F / Standardabweichung des *lack of closure*. Sind zwei Werte angegeben, so bezieht sich der erste auf die zentrischen und der zweite Wert auf die azentrischen Reflexe.

4.1.3.1 Multiple anomale Dispersion

Die anomalen Pattersonanalysen an den Wellenlängen L1 und L4 (f⁺-Maximum für Wolfram und Zink) zeigen Harker-Peaks für zwei dicht benachbarte Wolframpositionen und für zwei Zinkpositionen. Abbildung 9 zeigt die Harker-Schnitte $\frac{1}{2}vw$, $u\frac{1}{2}w$ und $uv\frac{1}{2}$ der anomalen Pattersonanalyse ($F^+ - F^-$) an der Wellenlänge L1 (f⁺-Maximum für Wolfram). In allen Sektionen sind deutliche Signale für zwei dicht benachbarte Wolframatome sichtbar. Der Peak zwischen den beiden Wolframpositionen entspricht dem Kreuzvektor der beiden benachbarten Wolframatome W1 und W2, die über eine zweizählige nicht-kristallographische Achse in Beziehung stehen. Ebenfalls sind die von den zwei Zinkpositionen (Zn1 und Zn2) zu erwartenden Harker-Peaks in den dargestellten Harker-Schnitten markiert. Die Analyse der anomalen Patterson-Karten an der Wellenlänge L4 (f⁺-Maximum für Zink) zeigt in den Harker-

Schnitten $\frac{1}{2}vw$, $u\frac{1}{2}w$ und $uv\frac{1}{2}$ jeweils zwei deutliche Signale an den in Abbildung 9 markierten Positionen für die von Zinkionen erzeugten Vektoren.

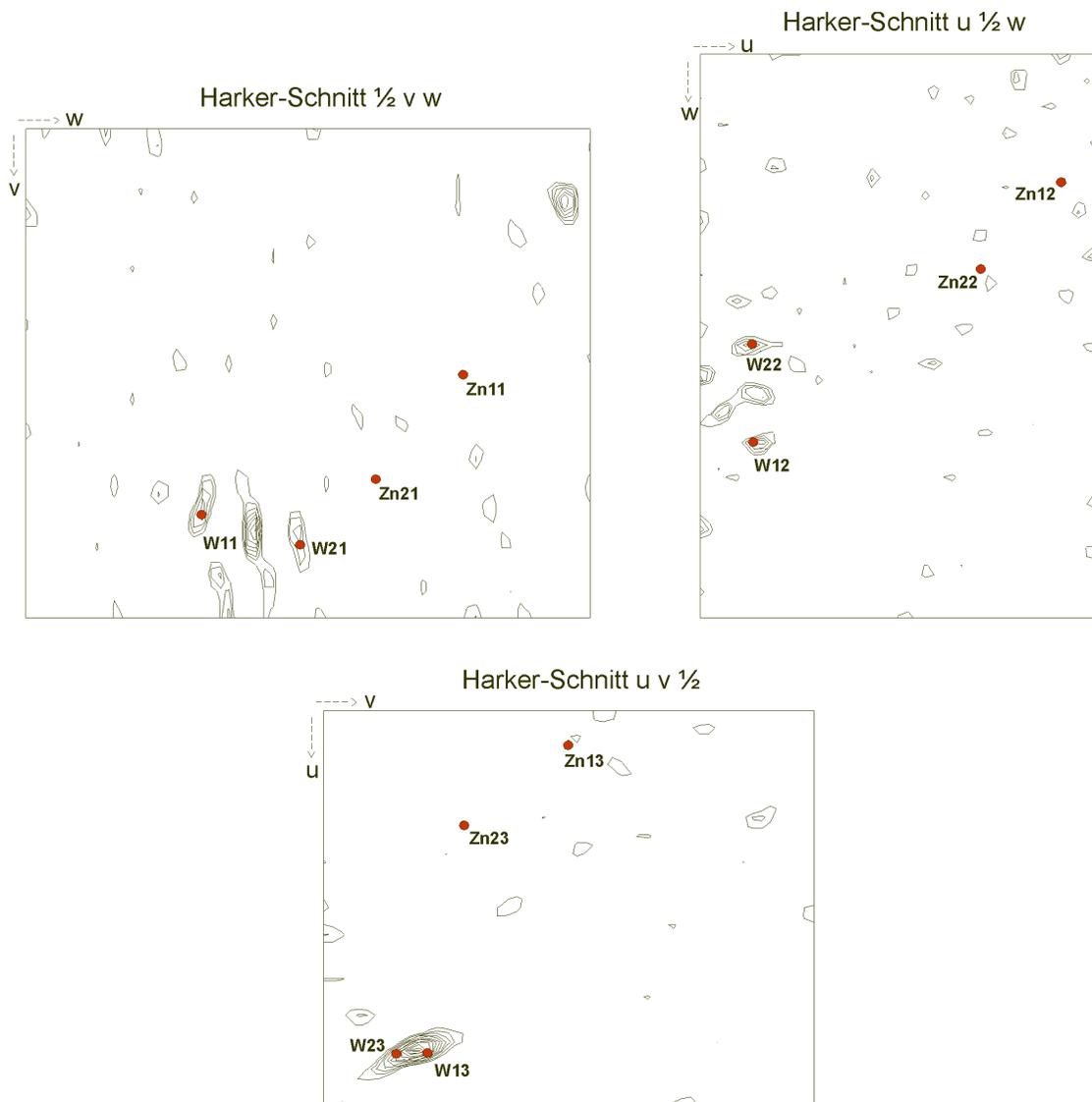


Abbildung 9: Anomale Pattersonanalyse an der Wolframkante. Harker-Schnitte durch die anomale Pattersonfunktion an der Wellenlänge L_1 im Auflösungsbereich von 6 bis 3 Å. Das Konturintervall beträgt $1 \sigma_{\text{rms}}$ ab 1σ . Die zwei Selbstvektoren der Wolframpositionen W1 und W2 sind mit roten Punkten markiert. Ebenso sind die Selbstvektoren der Zinkpositionen (Zn1 und Zn2) als rote Punkte gekennzeichnet.

Vor der Berechnung einer dispersiven Pattersonkarte wurden die bei fünf unterschiedlichen Wellenlängen gemessenen anomalen Daten mit dem Programm SCALA auf einen gemeinsamen Referenzdatensatz (L_4) skaliert. Die Wolfram- und Zinkbindungsstellen konnten durch Kreuzvektoren in einer L_5 - L_2 Differenz-Pattersonanalyse (Dispersive Patterson-Karte, Koeffizienten $|F_{L_5}| - |F_{L_2}|$) auf einen gemeinsamen Ursprung bezogen werden (Abbildung 10).

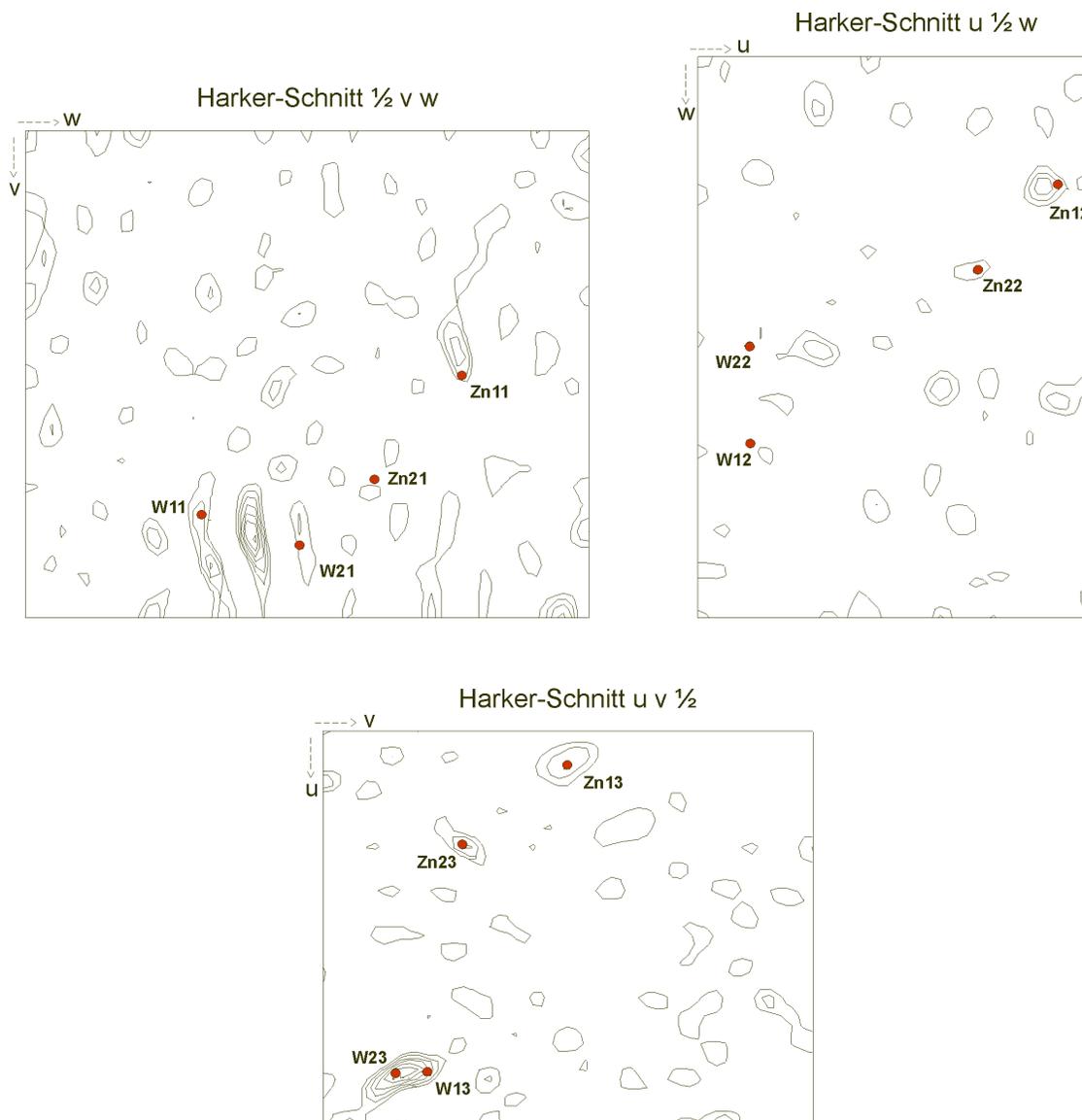


Abbildung 10: Dispersive Pattersonanalyse. L5-L2 Differenz-Pattersonanalyse berechnet für den Auflösungsbereich von 8 bis 4 Å für die Harker-Schnitte $\frac{1}{2}vw$ und $uv\frac{1}{2}$ sowie 15 bis 4 Å für den Harker-Schnitt $u\frac{1}{2}w$. Das Konturintervall beträgt $1 \sigma_{rms}$ ab 1σ . Die aus den zwei Wolframpositionen (W1 und W2) sowie aus den beiden Zinkpositionen (Zn1 und Zn2) erzeugten Harker-Vektoren sind rot markiert.

Die Auswertung der Patterson-Karten erfolgte mit dem Programm RSPS (CCP4, 1994). Die Lagen der Harker- und Kreuzvektoren ermöglichen die Lokalisierung der Schweratomkoordinaten im realen Raum. Die Schweratomkoordinaten (Tabelle 8) sowie die Besetzungs- und Temperaturfaktoren der jeweils zwei Wolfram- und Zinkatome wurden mit dem Programm SHARP (De La Fortelle & Bricogne, 1997) verfeinert.

Tabelle 8: Verfeinerte Koordinaten der Wolframatome und Zinkatome.

	x	y	z	Besetzungs- faktor	Temperatur- faktor (Å ²)
W1	0.034	0.554	0.078	1.0	76
W2	0.034	0.542	0.122	1.0	86
Zn1	0.770	0.626	0.193	1.0	26
Zn2	0.322	0.430	0.155	1.0	23

Zur Phasenbestimmung wurde das Programm SHARP benutzt. Tabelle 9 zeigt Details zur Phasierung mit SHARP. Die Güte des gemessenen Kristalls für die Phasenbestimmung wird durch die Berechnung der *phasing power* (PP), d.h. dem Verhältnis der Standardabweichung des berechneten Schweratomstrukturfaktors zur Standardabweichung des *lack of closure*

$$\left[\frac{\sum_n |F_H|^2}{\sum_n |E|^2} \right]^{1/2} \text{ mit } \sum_n |E|^2 = \sum_n \{ |F_{PH}(\text{obs})| - |F_{PH}(\text{calc})| \}^2 \text{ angegeben.}$$

Tabelle 9: MAD-Phasenbestimmung mit SHARP. FOM^a = 0.62 bis 2.8 Å

Datensatz	N	f' (W)	f'' (W)	f' (Zn)	f'' (Zn)	Phasing Power (PP)		
						anomale Diff. azentr. Reflexe	isomorphe Diff. zentr. Reflexe	azentr. Reflexe
L1	4	-12.4	18.3	-2.0*	3.8*	2.6	2.0	2.9
L2	4	-16.1	10.7	-2.0*	3.8*	2.7	1.6	2.6
L3	4	-9.0	14.0	-2.0*	3.8*	2.8	2.0	3.0
L4	4	-8.5*	4.5*	-6.3	4.4	1.6	1.9	2.6
L5	4	-8.5*	4.5*	-9.0	2.8	1.7	0.0	0.0

^aFOM = Figure of merit. FOM = <cos(Δα_h)>, wobei Δα_h der Fehler des Phasenwinkels für h ist.
*Diese Werte wurden bei der Phasenberechnung festgehalten

Die Temperaturfaktoren der beiden Wolframpositionen verfeinerten mit 70 und 79 Å² zu recht hohen Werten, was auf eine relativ ungeordnete Anbindung der Wolframationen hindeutet. Anzumerken ist, daß im endgültigen Modell der orthorhombischen Kristallform II vier Wolframat-

ionen verfeinert wurden. Dabei wurde ein Besetzungsfaktor von 0.5 eingesetzt und Temperaturfaktoren von 88 \AA^2 , 55 \AA^2 , 36 \AA^2 und 75 \AA^2 erhalten.

4.1.3.2 Multipler isomorpher Ersatz plus anomale Streuung

Ein „starkes“ isomorphes Schweratomderivat konnte bei keinem der aufgenommenen Datensätze gefunden werden. Die Inkubation mit SmCl_3 führte zu einer Anbindung von Sm^{3+} . Die inkubierten Kristalle wiesen jedoch eine hohe Nicht-Isomorphie zur nativen Kristallform auf, so daß die Differenz-Pattersonanalysen keine auswertbaren Peaks ergaben. Eine Bindungsstelle konnte jedoch in der anomalen Patterson-Karte lokalisiert werden (Abbildung 11).

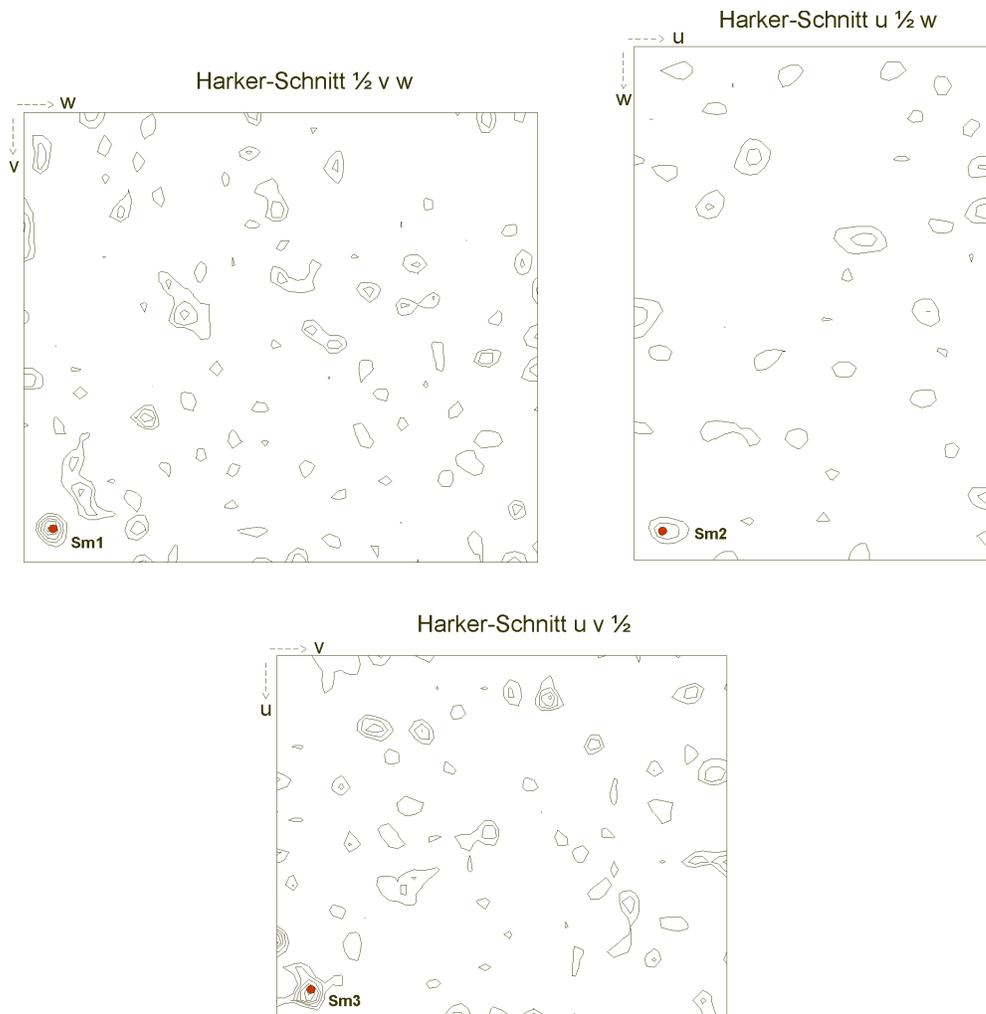


Abbildung 11: Anomale Pattersonanalyse für das SmCl_3 -Derivat. Berechnet für den Auflösungsbereich von 15 bis 3.5 \AA für die Harker-Schnitte $\frac{1}{2}vw$ und $uv\frac{1}{2}$, sowie für den Bereich von 15 bis 5 \AA für den Harker-Schnitt $u\frac{1}{2}w$. Das Konturintervall beträgt $1 \sigma_{\text{rms}}$ ab 1σ . Die aus der Samariumlage berechneten Selbstvektoren sind rot markiert.

Weiterhin deuteten Differenz-Pattersonanalysen für das PIP-Derivat das Vorhandensein einer Bindungsstelle an. Mit Hilfe der durch die MAD-Daten berechneten Proteinphasen wurden für dieses Derivat durch Differenz-Fourieranalyse (Amplituden $F_{\text{PIP}} - F_{\text{NATO}}$) negative Peaks an den Positionen der Wolframatom lokalisiert. Wahrscheinlich ist durch die Inkubation mit PIP ein Teil der Wolframationen aus der Bindungsstelle verdrängt worden.

Das nicht-isomorphe SmCl_3 -Derivat und das PIP-Derivat wurden zur Bestimmung von Proteinphasen mit Hilfe des Programms MLPHARE (CCP4, 1994) verwendet. Dabei wurde der PIP-Datensatz als nativer Datensatz benutzt und das native Protein und das SmCl_3 -Derivat als Schweratomdatensätze eingesetzt. Für das SmCl_3 -Derivat wurden die anomalen Differenzen zur Phasenbestimmung mit verwendet. Details zur Phasierung sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: MIRAS-Phasenbestimmung. Für die Phasenberechnung wurden die zwei Wolframpositionen ($x = 0.462, y = 0.462, z = 0.583$; $x = 0.474, y = 0.471, z = 0.624$) und die Samariumposition ($x = 0.481, y = 0.480, z = 0.485$) verwendet. $\text{FOM}^a = 0.39$ bis 2.8 \AA

Datensatz	f''	PP azentrische Reflexe	PP zentrische Reflexe
II-NAT	-	1.0	0.7
II-SM (SmCl_3)	2.7	1.1	0.8

^a $\text{FOM} = \text{Figure of merit}$. $\text{FOM} = \langle \cos(\Delta\alpha_h) \rangle$, wobei $\Delta\alpha_h$ der Fehler des Phasenwinkels für h ist.

4.1.3.3 Phasenverfeinerung

Die MAD-Phasen wurden durch Phasenverfeinerung verbessert, wobei zuerst eine Lösungsmittelglättung mit dem Programm DM (CCP4, 1994) durchgeführt wurde. Mit den so erhaltenen Elektronendichtekarten konnten Proteinbereiche und Lösungsmittelbereiche erkannt werden. Aus der Berechnung des Matthews-Koeffizienten und des somit berechneten Lösungsmittelanteils der orthorhombischen Kristallform II konnte abgeleitet werden, daß die asymmetrische Einheit zwei Proteinmoleküle umfaßt. Weiterhin konnten die Wolframationen zwischen zwei Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit in den ersten Elektronendichtekarten lokalisiert werden. Unter der Annahme, die Wolframationen lägen auf einer nicht-kristallographischen zwei-zähligen Drehachse, wurde mit den Positionen der Zinkionen ein erster, angenäherter Operator für das nicht-kristallographische Symmetrieelement bestimmt. Dieser Operator wurde durch Elektronendichtekorrelation optimiert, wobei ein Korrelationsfaktor von 0.4 berechnet wurde. Weiterhin wurde nun auch die nicht-kristallographische Symmetrie zur Phasenverfeinerung mit den Programmen DM und RAVE (Kleywegt, 1999) eingesetzt. Die so

erhaltenen Elektronendichtekarten zeigten längere Bereiche zusammenhängender Dichte und auch einige wenige helikale Bereiche, aber zu wenige Seitenketten und zu viele Brüche in der Hauptkette, um für den Modellbau interpretierbar zu sein. Daran konnten auch intensive Versuche zur Optimierung der Phasierung und Phasenverfeinerung nichts ändern.

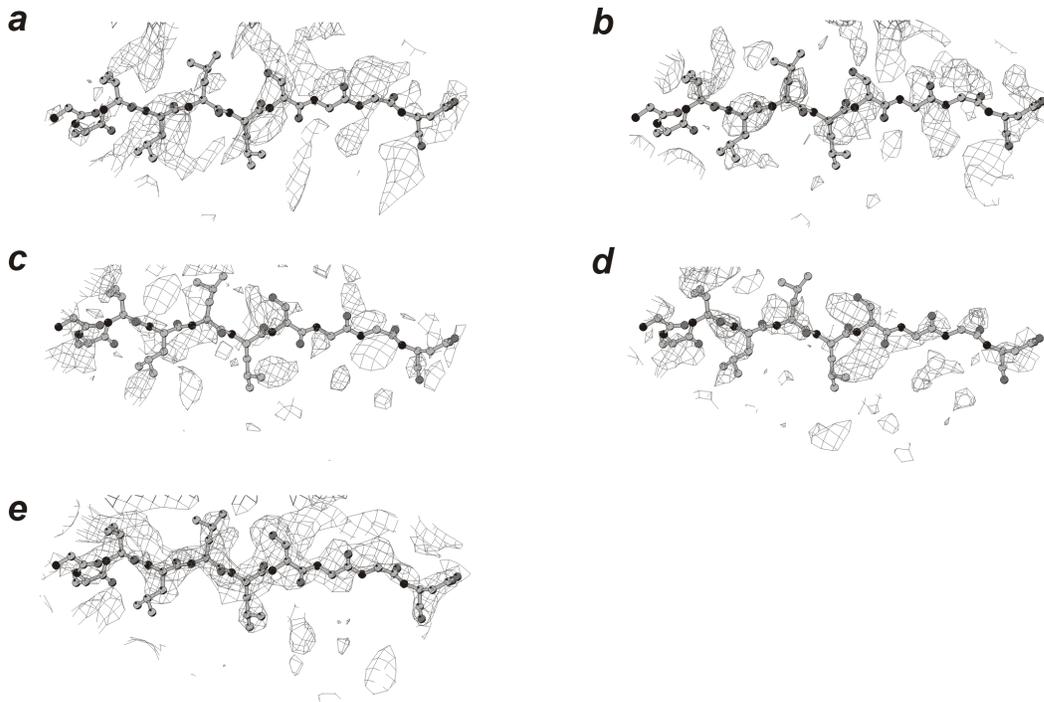


Abbildung 12: Vergleich der Elektronendichtekarten. **a**, Elektronendichte der nur aus den MAD-Daten berechneten Phasen. Auch die Lösungsmittelglättung mit dem Programm DM ergab keine Verbesserung der Dichte (**b**). Die aus den MIRAS-Phasen erhaltene Elektronendichte ist in **c** dargestellt, auch hier wurde eine Lösungsmittelglättung mit DM durchgeführt (**d**), die keine wesentliche Verbesserung der Dichte bewirkte. Erst die Kombination der Phaseninformationen aus den MAD- und MIRAS-Daten anhand einer Mittelung der Elektronendichtekarten mit dem Programm DMMULTI ergab interpretierbare Dichtekarten (**e**).

An dieser Stelle kamen die „schwachen“ MIRAS-Phasen der Raumtemperaturdatensätze zum Tragen. Da die Raumtemperaturdatensätze und die Datensätze der bei Tieftemperatur gemessenen orthorhombischen Kristalle eine hohen Grad an Nicht-Isomorphie aufwiesen, konnten diese Phaseninformationen nicht direkt kombiniert werden, sondern wurden über eine Mittelung der Elektronendichtekarten mit dem Programm DMMULTI (Cowtan, 1994) über verschiedene Kristalle kombiniert und verfeinert. Mit Hilfe einer Korrelation der MAD- und MIRAS-Elektronendichtekarten wurden Symmetrieeoperatoren bestimmt und die Phasen wurden dann durch Lösungsmittelglättung, Histogramm *Matching* und Dichtemittelung über die zwei Kristalle

verbessert. Die so erhaltenen Dichtekarten waren stark verbessert und interpretierbar (Abbildung 12).

4.1.4 Modellbau

Zur gleichzeitigen Darstellung der Elektronendichtekarten und Modellkoordinaten sowie zum Modellbau wurde das Programm O verwendet. Auf der Grundlage der mit DMMULTI (Cowtan, 1994) bis zu einer Auflösung von 2.8 Å erhaltenen Elektronendichtekarte wurde ein erstes Proteingerüst erstellt. Dieses Grundgerüst, das aus den potentiellen Lagen der C_{α} -Atome besteht, erlaubte einen großen Teil des Verlaufs der Peptidkette zu verfolgen. Auf der Grundlage des so erhaltenen Skeletons wurde der Verlauf der Polypeptidkette identifiziert. Hierbei war die Kenntnis der Aminosäuresequenz hilfreich, da versucht werden konnte, charakteristische Primärstruktur motive mit einer bestimmten Abfolge an dichtereichen (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) und dickearmen (Glycin, Alanin, Serin) Resten in der Elektronendichte zu lokalisieren. Besonders gut zu erkennen waren einige helikale Bereiche und die beiden aktiven Zentren der 5'-NT mit jeweils zwei Zinkatomen, die eine sehr hohe Elektronendichte aufwiesen. Die Liganden der Metallionen waren aufgrund von Sequenzvergleichen mit verwandten Phosphatasen bekannt. Es wurde eine Polyalaninkette in die Elektronendichte eingepaßt, deren neue Modellteile in die Dichte eingepaßt wurden. Hierbei waren die Ergebnisse einer Sekundärstrukturvorhersage hilfreich. Hiernach wurde die Polyalaninkette gegen die bekannte Aminosäuresequenz der 5'-NT Aminosäurerest für Aminosäurerest ausgetauscht. Als problematisch beim Bau des vorläufigen 5'-NT-Modells erwies sich die Interpretation der Elektronendichte in einigen Randbereichen des Proteins, da einige der dort auftretenden Proteinschlaufen aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit kaum Dichte aufwiesen und es deshalb nicht möglich war ein vollständiges Proteinmodell der 5'-NT zu bauen. Außerdem stellte sich heraus, nachdem der N- und C-Terminus identifiziert werden konnte, daß die Polyalaninkette entlang der falschen Richtung in die Elektronendichte eingepaßt wurde, was durch eine Umkehrung der Baurichtung behoben wurde.

4.1.5 Kristallographische Verfeinerung

Die Verfeinerung des Startmodells erfolgte durch Molekulardynamik-Verfeinerung mit dem Programm X-PLOR v3.84 (Brünger, 1993). Nach jedem Zyklus wurde das resultierende Modell im Vergleich zu den mit den neuen Strukturfaktoren berechneten Dichtekarten begutachtet und eventuelle Modifikationen mit Hilfe des Programms O vorgenommen. Die visuelle Begutachtung

des Modells und der jeweiligen Elektronendichtekarten unterliegt dem subjektiven Eindruck des Experimentators. Ein objektives Gütekriterium des vorliegenden Modells liegt dagegen mit dem kristallographischen R-Wert vor. Der freie R-Wert (R_{free}) diente in allen Phasen der Verfeinerung als Kriterium für ein optimales Verfeinerungsprotokoll (Brünger, 1992; 1993). Dieser ist wie der konventionelle kristallographische R-Wert definiert, wird jedoch ausschließlich für einen Satz von Testreflexen aufgestellt, der nicht in den Verfeinerungsprozeß selbst einbezogen wird. Der R_{free} zeigt somit an, inwieweit die Genauigkeit der Phasen des Modells sich bei der Verfeinerung verbessert hat. Bei der Verfeinerung wurde angestrebt, ein realistisches Atommodell durch eine möglichst gute Anpassung der Atomkoordinaten und Temperaturfaktoren an die Meßdaten zu erhalten. Dabei sollte die Anzahl der Freiheitsgrade deutlich kleiner sein als die der Meßwerte (Dodson *et al.*, 1996). Eine Verringerung der Freiheitsgrade wurde je nach Auflösung durch stereochemische Beschränkungen (auf Bindungslängen etc.) und unter Einsatz der nicht-kristallographischen Symmetrie erreicht.

Die orthorhombische Kristallform II enthält zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit, die durch eine nicht-kristallographische (d.h. lokale) Symmetrie miteinander verknüpft sind. Wegen Kristallpackungseffekten gilt diese Symmetrie nicht streng, wobei die Unterschiede mit steigender Auflösung stärker ins Gewicht fallen. Durch die Anwendung von Symmetriebeschränkungen wird einerseits das Meßdaten/Parameterverhältnis verbessert, andererseits werden Konformationsunterschiede zwischen den Monomeren unterdrückt. Deshalb wurden nur anfangs (bis der freie R-Wert unter 30 % gesunken war) nicht-kristallographische Beschränkungen (*restraints*) benutzt. Das vorläufige Anfangsmodell bestand aus 6838 Atomen (das entspricht 20514 Freiheitsgraden für die Koordinaten x, y und z) und wurde mittels einer Energieminimierung von 8 bis 2.5 Å verfeinert. Dabei wurden 48326 Reflexe mit einem Verhältnis von $F/\sigma_F > 2$ verwendet und es ergab sich ein R_{free} -Wert von 48.6 %. Im Anschluß an die Energieminimierung schloß sich ein simuliertes Aufheizen und Abkühlen an („*anneal*“, Starttemperatur 3000 K) wodurch der R_{free} auf 43.4 % gesenkt werden konnte. Die nach weiterer Energieminimierung erhaltene Elektronendichte war sehr gut interpretierbar, so daß viele Seitenkettenkonformationen sowie Schlaufenbereiche umgebaut bzw. erstmalig in die Elektronendichte eingebaut werden konnten. Diese neu modellierten Bereiche wurden anschließend in die darauffolgende Energieminimierung einbezogen.

Die orthorhombische Struktur wurde mit atomaren isotropen Temperaturfaktoren verfeinert, so daß das Modell pro Atom vier Parameter (x, y, z, B) enthält. Unrealistische Abweichungen der Temperaturfaktoren benachbarter Atome wurden beschränkt, wobei der

Sollwert für die Standardabweichungen zwischen 1.5 und 3.0 Å² lag (unterschiedlich für Haupt- und Seitenkettenatome sowie für Atome, die über eine oder zwei Bindungen verknüpft sind).

Zum Ende der Verfeinerung wurde in verbleibende Maxima der Differenzelektronendichte ($F_o - F_c$) auf der Proteinoberfläche als gebundene Wassermoleküle interpretiert, wenn für diese geeignete Bindungspartner vorhanden waren. Insgesamt enthält das Modell 137 Wassermoleküle, also etwa 0.1 pro Aminosäure. Außerdem konnten vier Wolframatmoleküle mit einem Besetzungsfaktor von 0.5 und fünf Zinkatome (neben den vier Zinkatomen im aktiven Zentrum) in die Differenzelektronendichte eingepaßt werden. Das Endmodell besteht aus 8180 Atomen (8014 Proteinatome, 137 Wassermoleküle, 9 Zinkatome, 4 Wolframatmoleküle) und wurde in einem Auflösungsbereich von 8 bis 2.2 Å (68946 Reflexe) zu einem R_{free} von 25.4 % ($R = 19.8$ %) verfeinert. Das Ergebnis der Verfeinerung ist in Tabelle 11 zusammengefaßt. Einige Bereiche der orthorhombische Kristallstruktur II zeigen wenig oder keine Elektronendichte und wurden nicht in das Modell aufgenommen. Monomer IIa enthält die Aminosäuren 26 bis 177, 183 bis 323, 330 bis 471, 479 bis 549 und Monomer IIb die Reste 26 bis 469, 474 bis 549. Bis auf zwei Ausnahmen im jeweiligen Monomer (IIa und IIb) des Modells der orthorhombischen Kristallform II (His-252 und His-289) liegen alle (ϕ , ψ)-Winkelpaare in den energetisch bevorzugten oder erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms (Abbildung 13).

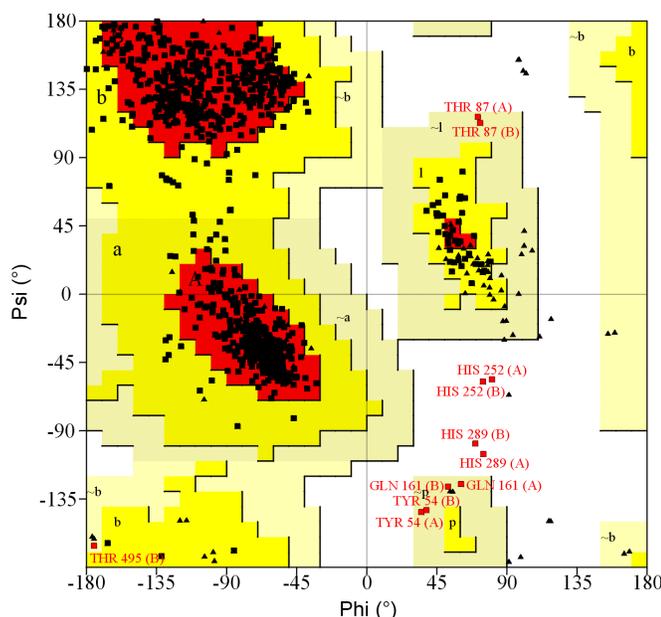


Abbildung 13: Ramachandran-Diagramm der Konformere IIa und IIb der Kristallform II. Die Bereiche sind in energetisch bevorzugte Regionen (A, B, L; rot), in zusätzlich erlaubte Regionen (a, b, l, p; gelb), in weniger erlaubte Regionen (~a, ~b, ~l, ~p; hellgelb) und in verbotene Regionen (weiß) unterteilt. Glycinreste werden durch Dreiecke symbolisiert.

Tabelle 11: Kristallographische Verfeinerung des nativen Datensatzes der orthorhombischen Kristallform II. Freiheitsgrade und Ergebnisse der Verfeinerung. Die Abweichung des Modells von der Standardgeometrie (Engh & Huber, 1991) sind als Wurzel der mittleren Quadrate angegeben.

II-NAT	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (Å)	a = 93.2, b = 116.3, c = 132.8
Anzahl Proteine pro AU ^a	2
Wasseranteil im Kristall (%)	60
F/σ _F Schranke	2
Auflösungsbereich (Å)	8 - 2.2
R / R _{free} (%)	19.8 / 25.4
Reflexe im Arbeits-/Test-Datensatz	68946 / 3437
Anzahl der Atome / < B > (Å ²)	
Protein	8014 / 41.4
Wassermoleküle	137 / 44.8
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.013
Rmsd Winkel (°)	1.95
Ramachandran-Ausreißer	H252, H289

^aAU, asymmetrische Einheit

4.2 Strukturlösung der tetragonalen Kristallform I

Ein hochaufgelöster Datensatz (bis 1.7 Å) der tetragonalen Kristallform I wurde am EMBL in Hamburg (DESY) an der Meßstation BW7A aufgenommen (I-NAT-1). Ebenso wurde ein Datensatz an der Wellenlänge 1.2825 Å, dem f^{''}-Maximum von Zink aufgenommen (I-NAT-2), mit dessen Hilfe die Berechnung einer anomalen Elektronendichte für die Zinkatome gelang. Tabelle 12 zeigt die kristallographische Datenstatistik für die beiden aufgenommenen Datensätze I-NAT-1 und I-NAT-2.

Tabelle 12: Kristallographische Datenstatistik. Gemessen wurden die beiden Datensätze I-NAT-1 und I-NAT-2 der tetragonalen Kristallform I (Raumgruppe P4₁2₁2).

Datensammlung	I-NAT-1	I-NAT-2
Temperatur (K)	100	100
Wellenlänge (Å)	0.981	1.2825 max. f ⁺ Zn
max. Auflösung (Å)	1.7	2.4
Gemessene Reflexe	188232	122332
Unabhängige Reflexe	68495	47847
Vollständigkeit (%)	98.4	99.7
R _{sym} (%) ^a	3.5	3.7
R _{ano} (%) ^b		2.6

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}.$$

$$^b R_{\text{ano}} = \frac{\sum |F_{(+)}^2 - F_{(-)}^2|}{\sum (F_{(+)}^2 + F_{(-)}^2)}.$$

4.2.1 Molekularer Ersatz

Eine Entscheidung zwischen den beiden enantiomorphen Raumgruppen P4₁2₁2 oder P4₃2₁2 konnte erst mit Hilfe des molekularen Ersatzes zugunsten von P4₁2₁2 getroffen werden, wobei beide Raumgruppen zur Bestimmung der Lage des Modells in der Elementarzelle (Translationsuche) ausprobiert werden, und nur die richtige Raumgruppe eine gute Lösung ergibt. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten V_m ergibt für die tetragonale Kristallform einen Wert von 2.8, unter der Annahme, daß sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet (die Anzahl der asymmetrischen Einheiten pro Zelle ist 8). Somit liegt in der asymmetrischen Einheit ein Monomer vor, und der Solvensgehalt berechnet sich zu etwa 55 % (berechnet mit einer Proteindichte von 1,23 g/ml).

Die Strukturlösung erfolgte mit der Methode des molekularen Ersatzes. Dabei wird in zwei Schritten erst die Orientierung (Rotationssuche), dann die Lage (Translationssuche) eines Modells in der Elementarzelle bestimmt. Als Suchmodell diente das noch nicht vollständig verfeinerte Monomer IIa der orthorhombischen Kristallform II. Die Rotationssuche mit dem Programm AMORE (Navaza, 1994) ergab eine hervorstechende Lösung der Rotationsfunktion mit einer Peakhöhe von 15.6 σ_{rms} . Auch Translationssuche in der Raumgruppe P4₁2₁2 zeigte bei einer Lage ein klares Maximum, das einen Korrelationskoeffizienten von 0.44 und einen kristallographischen R-Wert von 46.5 % besaß. In der enantiomorphen Raumgruppe P4₃2₁2

konnte dagegen keine signifikante Lösung der Translationsfunktion gefunden werden. Mit Hilfe einer Verfeinerung der Atomkoordinaten als starre Körper konnte mit AMORE die Orientierung und Lage des Moleküls dahingehend verbessert werden, daß der Korrelationskoeffizient auf 0.57 angehoben und der R-Wert auf 42.3 % gesenkt wurde. Die so erhaltene Orientierung und Lage des Moleküls wurde mit dem Programm PDBSET (CCP4, 1994) auf das benutzte Suchmodell angewendet, um es in die richtige Orientierung zu rotieren und in die richtige Lage zu translatieren.

Tabelle 13: Kristallographische Verfeinerung des Datensatzes I-NAT-1 der tetragonalen Kristallform I. Freiheitsgrade und Ergebnisse der Verfeinerung. Die Abweichung des Modells von der Standardgeometrie (Engh & Huber, 1991) sind als Wurzel der mittleren Quadrate angegeben.

I-NAT-1	
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellkonstanten (Å)	a = b = 83.6, c = 181.6
Anzahl Proteine pro AU ^a	1
Wasseranteil im Kristall (%)	55
F/σ _F Schranke	2
Auflösungsbereich (Å)	8 - 1.7
R / R _{free} (%)	18.0 / 21.9
Reflexe im Arbeits-/Test-	65786 / 3290
Datensatz	
Anzahl der Atome / < B > (Å ²)	
Protein	4018 / 14.4
Wassermoleküle	585 / 24.5
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.014
Rmsd Winkel (°)	1.80
Ramachandran-Ausreißer	H252, H289

^aAU, asymmetrische Einheit

4.2.2 Modellbau und kristallographische Verfeinerung

Die Differenz- und (2F_O-F_C)-Elektronendichtekarten wurden mit den Phasen des mittels AMORE bestimmten Enzymmodells berechnet. Dabei zeigte sich zwischen den beiden Zinkatomen eine starke Dichte, die in späteren Zyklen der Verfeinerung als Bicarbonat interpretiert wurde. Die Verfeinerung (Programm X-PLOR v3.84) erfolgte zunächst mit einem simulierten Aufheizen und Abkühlen der Struktur mit 65786 Reflexen des Datenbereichs 8.0 bis 1.7 Å (F/σ_F > 2, 91.7 % Vollständigkeit). Hierdurch konnte jedoch der anfängliche R_{free} von 40.8 % (R = 40.1 %) kaum

gesenkt werden ($R_{\text{free}}/R = 40.1/35.6 \%$). Dagegen brachte eine sich anschließende Energie-minimierung und B-Wert-Verfeinerung eine Absenkung um etwa 10 % ($R_{\text{free}}/R = 30.0/26.6 \%$). Durch den Einbau von Wassermolekülen, vier Sulfatmolekülen und einem Bicarbonation (das im aktive Zentrum gebunden ist) in die Differenzelektronendichte, verbesserte sich der R_{free} am Ende der Verfeinerung auf 21.9 % ($R = 18.0 \%$). Unrealistische Abweichungen der isotropen Temperaturfaktoren benachbarter Atome wurden auch hier beschränkt, wobei der Sollwert für die Standardabweichungen zwischen 1.5 und 2.5 Å² lag (unterschiedlich für Haupt- bzw. Seitenkettenatome, sowie für Atome, die über eine oder zwei Bindungen verknüpft sind). Es wurden insgesamt 4629 Atome mit jeweils vier (x, y, z, B) Freiheitsgraden verfeinert. Davon sind 4018 Proteinatome, 585 Wassermoleküle (etwa 1.1 Wassermoleküle pro Aminosäurerest), zwei Zinkatome des aktiven Zentrums, ein Bicarbonation und vier Sulfationen. Das Ergebnis der Verfeinerung ist in Tabelle 13 zusammengefaßt. Am Ende konnten die Reste 26 bis 321 und 332 bis 550 gebaut bzw. in der Elektronendichte identifiziert werden. Auch in der tetragonalen Kristallstruktur I liegen bis auf zwei Ausnahmen (His-252 und His-289) alle (ϕ , ψ)-Winkelpaare in den energetisch bevorzugten oder erlaubten Regionen des Ramachandran Diagramms (Abbildung 14).

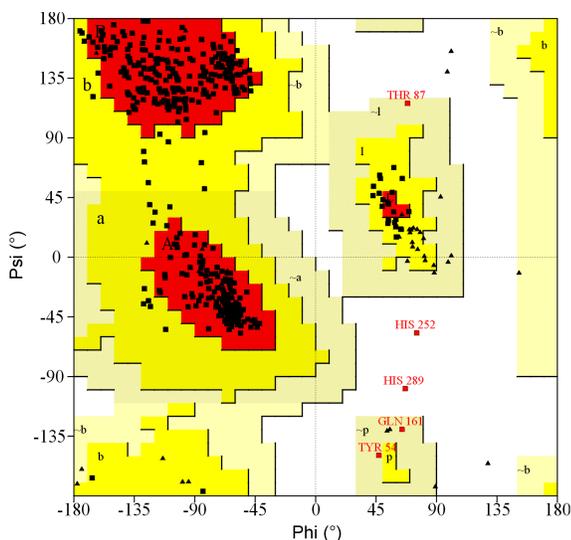


Abbildung 14: Ramachandran-Diagramm der Struktur I-NAT-1 der Kristallform I. Die Bereiche sind in energetisch bevorzugte Regionen (A, B, L; rot), in zusätzlich erlaubte Regionen (a, b, l, p; gelb), in weniger erlaubte Regionen (~a, ~b, ~l, ~p; hellgelb) und in verbotene Regionen (weiß) unterteilt. Glycinreste werden durch Dreiecke symbolisiert.

4.3 Strukturbeschreibung der offenen Konformation

Die folgende Strukturbeschreibung geht vor allem von der hochaufgelösten tetragonalen Kristallform I aus. Wenn auf die orthorhombische Kristallform II eingegangen wird, so ist es im Text vermerkt. Die Reste 26 bis 321 und 332 bis 550 konnten in das verfeinerte Modell der 5'-NT in die 1.7 Å Elektronendichte eingebaut werden. Nur ein ungeordneter Schlaufenbereich, der die Reste 322 bis 331 umfaßt, konnte nicht in das endgültige Modell der 5'-NT aufgenommen werden. Auch zeigt das Modell, daß die Signalsequenz (Reste 1 bis 25), die für den Transport des Enzyms in den periplasmatischen Raum verantwortlich ist, abgespalten worden ist. Somit verbleiben 525 Reste (einschließlich des ungeordneten Schlaufenbereichs) mit einer Molekularmasse von 58.1 kDa.

4.3.1 Die Tertiärstruktur der 5'-NT

Die 5'-NT aus *E. coli* besitzt eine monomere Struktur mit einer Größe von etwa 80 x 45 x 55 Å³. Dies bestätigen Gelfiltrationsexperimente, in denen sich das Enzym ebenfalls wie ein Monomer verhält (Neu, 1967; 1968). Das Protein besteht aus zwei Domänen mit α/β -Struktur, die durch eine α -Helix ($\alpha 8$) miteinander verbunden sind (Abbildung 15). Die größere N-terminale Domäne (Reste 26 bis 342) besitzt eine 4-lagige Struktur der Zusammensetzung α/β - β - β - α , die aus zwei gemischten β -Faltblatt-Sandwiches, die die zweite und dritte Schicht der 4-schichtigen Struktur ausbilden, besteht. Diese zwei Faltblatt-Sandwiches bestehen aus jeweils sechs β -Strängen, die auf der einen Seite durch die Helices $\alpha 1$, $\alpha 3$ sowie $\alpha 5$ und auf der anderen Seite von den Helices $\alpha 6$ sowie $\alpha 7$ abgeschirmt werden. Jedes dieser beiden Faltblätter besitzt ein charakteristisches $\beta\alpha\beta\alpha$ -Motiv ($\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2/3$ - $\beta 3$ und $\beta 8$ - $\alpha 6$ - $\beta 10$ - $\alpha 7$ - $\beta 11$) mit zueinander parallelen β -Strängen (Abbildung 16). Dieses Faltungsmotiv ist typisch für die $\beta\alpha\beta\alpha$ -Metallophosphoesterase-Superfamilie. Innerhalb eines dieser $\beta\alpha\beta\alpha$ -Motive ist zwischen $\beta 8$ und $\alpha 6$ ein kurzer β -Strang ($\beta 9$) eingebaut. Die kleinere C-terminale Domäne (Reste 362 bis 550) setzt sich aus einer 4-schichtigen α/β - β - α - β -Struktur zusammen, dessen Kern aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt ($\beta 27$, $\beta 21$, $\beta 26$, $\beta 19$ und $\beta 22$) besteht, das von Helix $\alpha 12$ und der Schlaufe zwischen $\alpha 13$ und $\beta 27$ auf der einen Seite und vor allem von Helix $\alpha 10$ auf der anderen Seite abgeschirmt wird.

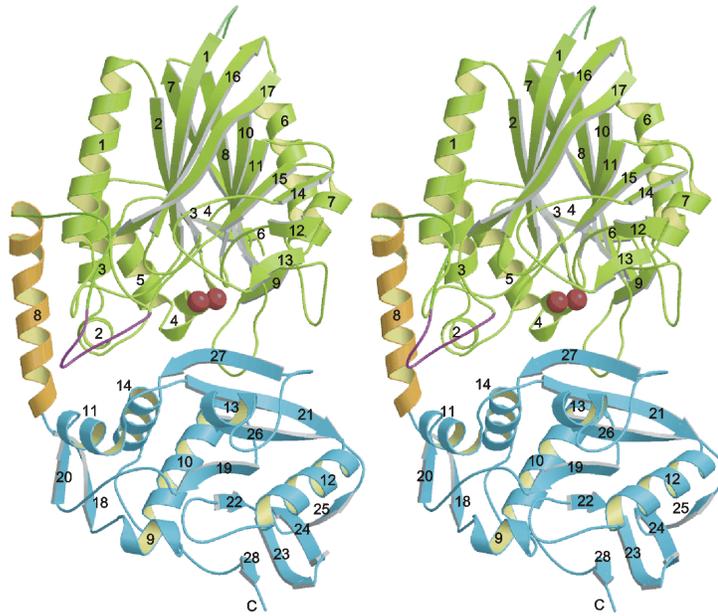


Abbildung 15: Tertiärstruktur der 5'-NT (stereo). Schematische Darstellung der Tertiärstruktur, bei der die β -Stränge als Pfeile und Helices als Spiralen dargestellt sind. Die Sekundärstrukturelemente wurden mit einem Algorithmus von Kabsch und Sander im Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) berechnet und manuell korrigiert. Die N-terminale Domäne ist grün und die C-terminale Domäne ist blau dargestellt. Die Domänen-verbundene Helix ist in orange und die beiden Zinkatome sind in rot gezeichnet.

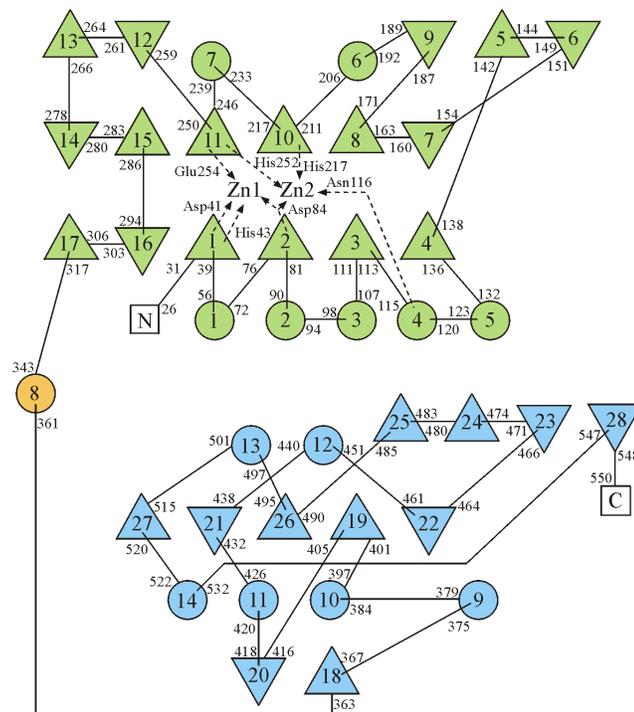


Abbildung 16: Topographie-Diagramm des 5'-NT-Monomers. β -Stränge werden durch Dreiecke (deren Spitze nach oben zeigt, wenn das C-terminale Ende des β -Stranges in Richtung des Betrachters zeigt) und Helices durch Kreise repräsentiert. Das Farbschema entspricht dem aus Abbildung 15. Die Positionen der Metall ligandierenden Reste sind mit Pfeilen markiert.

Abbildung 17 zeigt die molekulare Oberfläche der 5'-NT. Der Zugang zum aktiven Zentrum sollte auf kleine (nicht-Protein) Substrate begrenzt sein, da sich die Bindungsstelle in einer relativ engen Spalte befindet. Der Bereich des aktiven Zentrums besitzt ein positives elektrostatisches Potential, welches negativ geladene Phosphoester anzieht und somit wichtig für die Substratbindung und die Katalyse ist. Andere Bereiche der sich zwischen den beiden Domänen befindlichen Spalte besitzen wiederum ein negatives Potential. An der Grenzfläche zwischen den beiden Domänen treten relativ wenige Wechselwirkungen auf. Nur einige wenige Reste der Proteinschlaufen am C-terminalen Ende der zwei $\beta\alpha\beta$ -Motive (einschließlich Helix α_4) der N-terminalen Domäne und einige Reste des Stranges β_{27} der kleineren C-terminalen Domäne können Kontakte zum aktiven Zentrum ausbilden. Eine Analyse der Domänengrenzfläche ergab folgende mögliche Kontakte (Abstände $< 4 \text{ \AA}$): α_2 mit α_{14} und α_{11} , α_4 mit β_{27} , der Schlaufenbereich zwischen β_8 und β_9 mit α_{10} und β_{21} sowie der Schlaufenbereich zwischen β_{10} und α_7 mit dem Schlaufenbereich vor Strang β_{27} . Cys-258 und Cys-275 bilden eine Disulfidbrücke aus, die wahrscheinlich den Schlaufenbereich zwischen den beiden Cysteinen stabilisieren (einschließlich zweier kurzer β -Stränge, β_{12} und β_{13}).

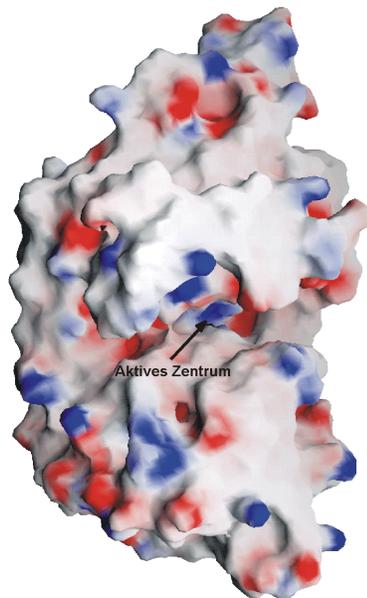


Abbildung 17: Molekulare Oberfläche der offenen Konformation erzeugt mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1991). Der Probenradius beträgt 1.4 \AA und alle Proteinreste sowie die beiden Zinkatome sind Teil des Modells. Die Farbgebung der Oberfläche entspricht dem elektrostatischen Potential (blau für positives und rot für negatives Potential), welches mit DELPHI (Gilson *et al.*, 1987) berechnet wurde. Für die Berechnung mit DELPHI wurde das Proteinmodell einschließlich der zwei Metallionen verwendet. Asp, Glu, Arg, Lys, die Aminosäuren des N- und C-Terminus und die beiden Zinkionen trugen Ladungen. Die Orientierung des Moleküls entspricht der in Abbildung 15. Das aktive Zentrum befindet sich in einer 20 \AA tiefen Spalte zwischen den beiden Domänen.

4.3.2 Domänenrotation innerhalb der Kristallformen I und II

Zusätzlich zur 1.7 Å Struktur der tetragonalen Kristallform I (mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit) gelang es, eine orthorhombische Struktur II bis 2.2 Å, mit zwei unabhängigen Molekülen (IIa und IIb) in der asymmetrischen Einheit zu bestimmen. Die Überlagerung der C_{α} -Positionen der zwei Monomere in der orthorhombischen Kristallform ergibt eine mittlere quadratische Standardabweichung von 0.40 Å, während die Überlagerung des orthorhombischen Modells mit der tetragonalen Struktur eine Standardabweichung von 1.14 Å ergibt. Dagegen ergab eine separate Überlagerung der N- bzw. C-terminalen Domänen signifikant geringere Standardabweichungen von 0.54 Å für die Überlagerung der N-terminalen Domänen und 0.34 Å für die Überlagerung der C-terminalen Domänen. Dieses Ergebnis deutet einerseits auf geringe strukturelle Variationen innerhalb der jeweiligen Domänen, und andererseits auf eine unterschiedliche Orientierung der Domänen relativ zueinander hin. Abbildung 18 zeigt die Überlagerung der beiden Kristallstrukturen mit der größeren N-terminalen Domäne als Referenzdomäne. Bei diesem Vergleich rotiert die C-terminale Domäne der Kristallstruktur IIa um 10.2°, relativ zur C-terminalen Domäne der Struktur I, um eine Achse, die nahe des aktiven Zentrums am C_{α} -Atom des Restes Asn-517 im β -Strang β 27 entlang läuft. Da die Translationskomponente entlang der Schraubenachse nur 0.07 Å beträgt, kann die Bewegung als reine Rotation um eine Rotationsachse beschrieben werden. Eine genauere Beschreibung der Rotationsbewegung findet in Kapitel 6 statt.

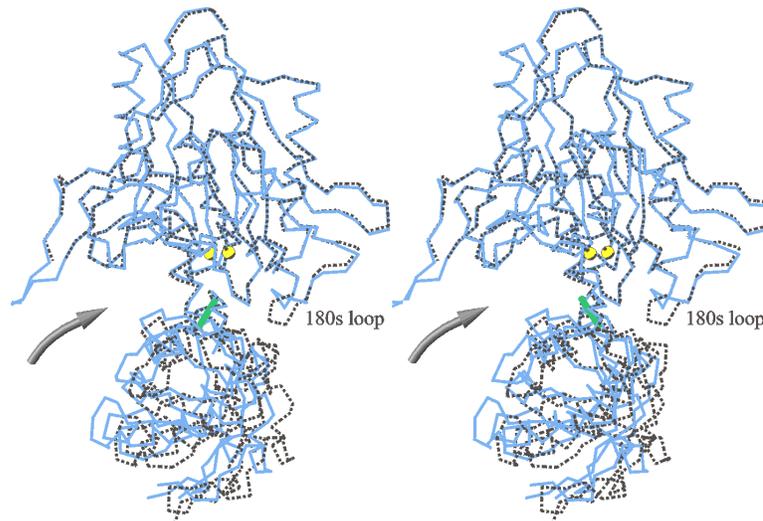


Abbildung 18: Domänenbewegung innerhalb der beiden geschlossenen Kristallformen I und II (stereo). Überlagerung des Konformeres I der 5'-NT (schwarz, gestrichelte Linie) mit einem verfeinerten Molekül (IIa) der orthorhombischen Kristallform II (blaue Linien). Es wurden die C_{α} -Atomkoordinaten der N-terminalen Domänen als Referenz benutzt. Die beiden C-terminalen Domänen rotieren um 10.2° relativ zueinander um eine Achse, die grün dargestellt ist. Die Spalte, die den Zugang zum aktiven Zentrum ermöglicht befindet sich auf der linken Seite der Rotationsachse und ist durch einen Pfeil markiert.

4.3.3 Das aktive Zentrum

Die wichtigsten Reste für die Katalyse sind der Dimetall-Cluster mit seinen Liganden und potentiell gebundenen Wasser-Nucleophilen, ebenso wie ein katalytisches Asp-His-Paar, bestehend aus His-117 und Asp-120. Zusätzlich zu diesen Resten, die sich in Schlaufenbereichen an den C-terminalen Enden der parallelen Stränge der $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motive befinden, sind Reste der Stranges $\beta 27$ in der Nähe des aktiven Zentrums. Allerdings ist keine von diesen Seitenketten (an Strang $\beta 27$) derartig positioniert, daß sie direkt an katalytischen Umsetzungsschritten teilnehmen könnten (Abbildung 19). Die Carbonylgruppe von Thr-518 ist mittels einer Wasserstoffbrücke mit dem katalytisch wirkenden His-117 verbunden.

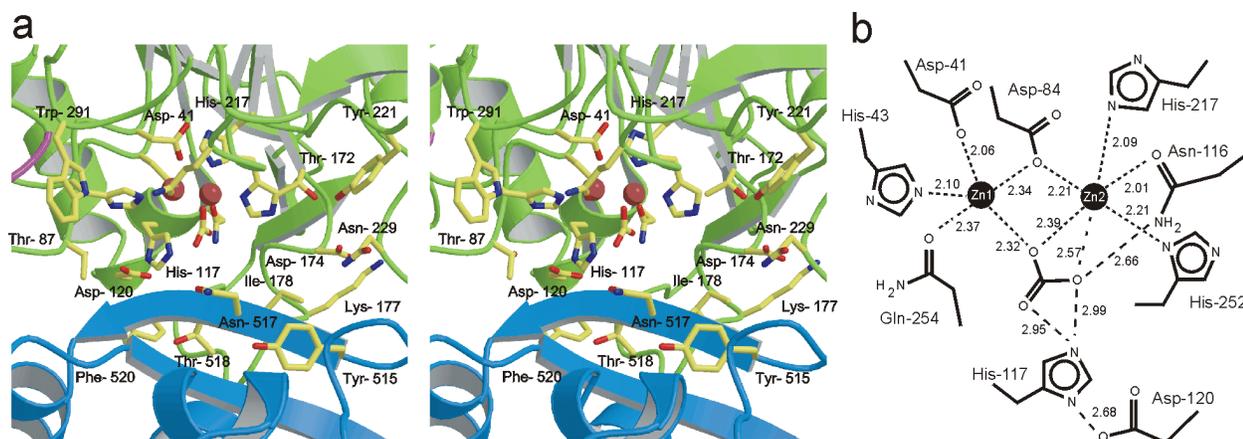


Abbildung 19: Das aktive Zentrum der 5'-NT in Kristallform I. **a**, Stereoabbildung ausgewählter Aminosäurereste, die sich nahe am Zinkcluster befinden. Die N-terminale Domäne ist grün und die C-terminale Domäne ist blau gezeichnet. **b**, Schematische Darstellung des Dizinkzentrums, des Bicarbonations und des katalytischen Asp-His-Paars. In der orthorhombischen Kristallform II sind anstelle des Bicarbonations zwei Wassermoleküle gebunden. Die Anzahl der Dezimalstellen spiegelt nicht unbedingt die Genauigkeit der Meßwerte wieder.

Beide Metallionen konnten eindeutig als Zinkionen identifiziert werden (Abbildung 20). Dazu wurde mit dem anomalen Datensatz NATANO, der an der Zinkabsorptionskante gemessen wurde (vgl. Tabelle 12), eine Differenz-Fourier ($|F_{\text{NATANO}}^+ - F_{\text{NATANO}}^-| * \Phi_C$) Elektronendichtekarte berechnet. In dieser Elektronendichtekarte besitzen die beiden Zinkionen Zn1 und Zn2 eine Peakhöhe von 30 und 50 σ_{rms} . Auch in der orthorhombischen Kristallform sind beide Metallbindungsstellen mit Zinkionen besetzt. Dies konnte mit Hilfe einer anomalen Differenz-Fourier ($|F_{\text{L4}}^+ - F_{\text{L4}}^-| * \Phi_C$) Elektronendichtekarte gezeigt werden (Daten sind nicht gezeigt). Somit konnten die Metalle in beiden Kristallform als Zinkionen verfeinert werden. Dabei wurden die atomaren Temperaturfaktoren (B-Faktoren) für Zn1 zu 29.8 \AA^2 und für Zn2 zu 13.0 \AA^2 verfeinert. Die metallgebundenen Reste besitzen B-Faktoren unter 10 \AA^2 . Der relativ hohe B-

Faktor von Zn1 und das schwächere anomale Signal deuten auf eine nicht vollständig besetzte Metallbindungsstelle 1 hin. Eine weitere Möglichkeit ist die teilweise Besetzung der Bindungsstelle mit einem Metallion, das weniger Elektronen als Zink besitzt, beispielsweise Mg^{2+} . Demnach müsste die Zn1-Bindungsstelle eine gewisse Flexibilität oder statische Unordnung aufweisen. Dies sollte allerdings ebenfalls Auswirkungen auf die an Zn1 gebundenen Liganden haben, was nicht der Fall ist, denn deren B-Faktoren sind genauso klein ($< 10 \text{ \AA}$) wie die der Liganden, die an Zn2 gebunden sind. Jedenfalls zeigt das anomale Signal eindeutig, daß die Zn1-Bindungsstelle hauptsächlich mit Zn^{2+} besetzt ist. Im Vergleich dazu besitzen die beiden Zinkionen in der orthorhombischen Struktur II einen B-Faktor von 31 \AA^2 . Ähnlich hohe Temperaturfaktoren konnten für die metallkoordinierenden Liganden ermittelt werden. Da Zinkionen in einer Konzentration von 25 \mu M bzw. 15 mM im Kristallisationspuffer der tetragonalen und orthorhombischen Kristalle vorlagen, kann aus dem vorliegenden Ergebnis nicht auf ein *in vivo* vorliegendes Dizinkprotein geschlossen werden. Genauso könnte die 5'-NT auch ein heterodinukleares Metallzentrum besitzen. An mit ^{65}Zn markierter 5'-NT aus *E. coli* konnte gezeigt werden, daß das Enzym mindestens ein fest gebundenes Zinkion enthält (Dvorak & Heppel, 1968).

Alle an die beiden Zinkionen koordinierten Proteinliganden sind in der Elektronendichtekarte ausgezeichnet definiert (Abbildung 20). Zusätzlich zeigt die Dichte deutliche Restelektronendichte am Zinkcluster. Die Restdichte besitzt eine trigonal planare Form und kann nicht durch die Gegenwart von Wassermolekülen (zwei oder mehr) erklärt werden, da sie nach der Verfeinerung nur noch etwa 2 \AA voneinander entfernt sind. Dagegen läßt sich ein Acetation aus dem Kristallisationspuffer oder ein Bicarbonation, das sich nach dem Lösen von Kohlenstoffdioxid im Puffer gebildet hat, sehr gut in die Dichte einpassen. Am Ende wurde ein Carbonation in die Dichte eingepaßt und verfeinert, dessen Sauerstoffatome entweder an die Metallionen koordinieren oder mit daran koordinierten Liganden Wasserstoffbrücken ausbilden (Abbildung 19b). Das Sauerstoffatom der Carbonations, das am weitesten von den beiden Zinkionen entfernt ist, befindet sich im Wasserstoffbrückenabstand zu His-117 und einem Wassermolekül ($\sim 2.6 \text{ \AA}$). Diese polaren Kontakte widersprechen der Gegenwart eines Acetations. Die verfeinerten atomaren Temperaturfaktoren für das Bicarbonation liegen zwischen 18 und 25 \AA^2 . Eines der Carbonatsauerstoffatome überbrückt die beiden Zinkatome und ein anderes Sauerstoffatom ist über eine Wasserstoffbrücke mit His-117 verbunden. In der 2.2 \AA Struktur der orthorhombischen Kristallform II ersetzen zwei Wassermoleküle in Wasserstoffbrückendistanz das Carbonation der tetragonalen Form. Eines dieser Wassermoleküle überbrückt Zn1 und Zn2 in Abständen von 1.9 und 2.1 \AA , während sich das andere

Wassermolekül in Wasserstoffbrückendistanz zu His-117 befindet. Anzumerken ist, daß das an das aktive Zentrum gebundene Carbonation der tetragonalen Kristallform vor allem ein Artefakt der Kristallisations- und Datensammelungsbedingungen ist. Es ist nicht experimentell gesichert, ob dieses Carbonation für die Katalyse von Relevanz ist. Es kann allerdings als Modell für den trigonal planaren Teil eines pentagonalen Übergangszustandes bzw. für einen Metaphosphat ähnlichen Übergangszustand dienen.

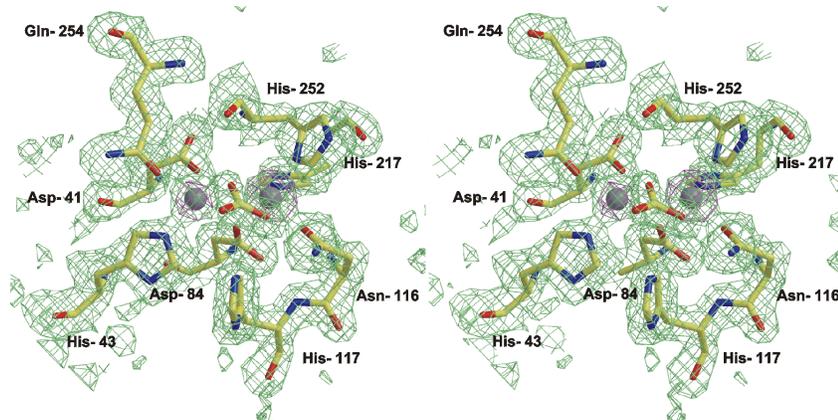


Abbildung 20: Stereodarstellung einer Elektronendichtekarte, für deren Berechnung sämtliche dargestellten Aminosäuren und Metallionen aus dem Modell ausgenommen wurden (*Omit*-Elektronendichtekarte). Die *Omit*-Elektronendichtekarte ($|F_O - F_C| * \Phi_C$) ist grün dargestellt, während die anomale Dichtekarte ($|F_{NATANO}^+ - F_{NATANO}^-| * \Phi_C$) der zwei Zinkionen (Zn1 ist links) in violett gezeichnet ist. Ebenfalls dargestellt ist das an die beiden Metallionen gebundene Bicarbonation und His-117.

Tabelle 14: Koordinationsgeometrie des dinuklearen Metallzentrums der 5'-NT in Kristallform I.

Koordinationsabstände (Å)					
	Asp-41Oδ2	His-43Nε2	Asp-84Oδ2	Gln-254Oε1	CO ₃ -O1
Zn1	2.06	2.10	2.34	2.37	2.32
	Asp-84Oδ2	Asn-116Oδ1	His-217Nε2	His-252Nδ1	CO ₃ -O1
Zn2	2.21	2.01	2.09	2.21	2.39
Koordinationswinkel ^a (°)					
D84-Zn1-Q254	167.7 (180)		D84-Zn2-H252	164.9 (180)	
D41-Zn1-H43	116.6 (120)		H217-Zn2-N116	94.2 (120)	
H43-Zn1-W	132.4 (120)		H217-Zn2-W	136.1 (120)	
D41-Zn1-W	110.9 (120)		N116-Zn2-W	129.5 (120)	
D84-Zn1-D41	93.1 (90)		D84-Zn2-H217	86.7 (90)	
D84-Zn1-H43	91.9 (90)		D84-Zn2-N116	96.9 (90)	
D84-Zn1-W	80.6 (90)		D84-Zn2-W	83.7 (90)	

^aWinkel in Klammern entsprechen den idealen Werten einer trigonal bipyramidalen Koordination

Beide Zinkionen werden von fünf Liganden trigonal bipyramidal koordiniert. Dabei besetzt O δ 2 von Asp-84 apicale Positionen beider Bipyramiden (Tabelle 14) und O ϵ 1 von Gln-254 und N ϵ 1 von His-252 bilden die anderen apicalen Positionen der Koordinationssphäre um Zn1 und Zn2. Die Entfernung beider Metallionen voneinander beträgt 3.3 Å (3.4 Å in der orthorhombischen Kristallform II) und beide sind über Asp-84 einem Wassermolekül oder einem Bicarbonation monodentat verbrückt. Ein zweites Sauerstoffatom (O3) des Carbonations bildet in einer Entfernung von 2.57 Å schwache Wechselwirkungen mit Zn2 aus. Weitere Metall-Ligand-Abstände sind in Abbildung 19b aufgeführt. Neben dem Metallcluster sind nur His-117 und Wassermoleküle im aktiven Zentrum derartig positioniert, daß sie direkt an der Katalyse des Phosphoryltransfers teilnehmen können.

4.4 Strukturbeschreibung eines Substratkomplexes der offenen Form der 5'-NT mit ATP

4.4.1 Datensammlung und Verfeinerung

Zur Identifizierung der Substratbindungstasche der 5'-NT aus *E. coli* wurden tetragonale Kristalle der Form I mit 1mM ATP für 30 min inkubiert. Anschließend wurde ein Kristall für die Tieftemperaturmessung in Paratone-N überführt. Die Beugungsdaten wurden am EMBL in Hamburg (DESY) an Meßstation BW7B mit einem MAR Image-Plate-System bei 100 K aufgenommen. Für die kristallographische Verfeinerung wurde das Modell der tetragonalen Struktur I benutzt. Am Ende der Verfeinerungszyklen wurde ATP in die Restelektronendichte eingepaßt und mittels simuliertem Aufheizen und Abkühlen („anneal“) optimal in die Dichte eingebaut. Die beiden ersten Phosphate (α - und β -Phosphat), die an das Adenosin gebunden sind, sind gut in der Elektronendichte definiert, nur die Dichte des γ -Phosphats ist erst ab einem σ_{rms} von 0.5 erkennbar. Dies läßt auf eine hohe Beweglichkeit der Phosphatgruppen, vor allem des γ -Phosphat schließen. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Datensammlung und Verfeinerung des ATP-Substratkomplexes der tetragonalen Kristallform I zusammengefaßt.

Tabelle 15: Kristallographische Datenstatistik des ATP-Substratkomplexes. Die Abweichungen des Modells von der Standardgeometrie (Engh & Huber, 1991) sind als Wurzel der mittleren Quadrate angegeben.

I-ATP	
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellkonstanten (Å)	a = b = 83.7, c = 181.8
Temperatur (K)	100
max. Auflösung (Å)	1.7
aufgenommene Reflexe	478470
Unabhängige Reflexe	71863
Vollständigkeit (%) ^a	98.1 (92.2)
R _{sym} (%) ^{a, b}	4.4 (12.9)
Verfeinerung	
Auflösung (Å)	50 - 1.7
F / σ _F	-
R / R _{free} ^c	17.6 / 19.9
Reflexe im Arbeits-/Test-Datensatz	68752 / 2164
Proteinatome	4027
Wassermoleküle	739
<B Protein (Å ²)>	15.6
<B Wasser (Å ²)>	27.8
<B ATP (Å ²)>	47.6
Rmsd Bindungslängen (Å)	0.012
Rmsd Bindungswinkel (°)	1.69

^aIn Klammern sind Werte für die höchsten Auflösungsschale angegeben.

^b $R_{\text{sym}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$.

^c $R = \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{O}}(\text{hkl}) - F_{\text{C}}(\text{hkl})| / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{O}}(\text{hkl})|$; R_{free} = R-Faktor der Reflexe im Testdatensatz.

4.4.2 Strukturbeschreibung

Das Substrat ATP bindet an der C-terminalen Domäne mit einem Abstand von etwa 20 Å zum katalytischen Zentrum (Abbildung 21). Diese große Entfernung des Substrates vom aktiven Zentrum der 5'-NT macht deutlich, daß es sich bei dieser Konformation des Enzyms nicht um eine aktive Konformation handeln kann. Denn für eine katalytische Umsetzung des ATP zu ADP und Phosphat müßte sich wenigstens ein Sauerstoffatom der γ-Phosphatgruppe nahe an einem

Zinkatom befinden, da die Metallkatalyse der Phosphatesterhydrolyse für diese Enzymfamilie durch zahlreiche Ergebnisse etabliert ist. Allerdings erlaubt die Analyse dieses ATP-Substratkomplexes die Identifizierung der Bindungsstelle und wichtiger Aminosäurereste, die für die Anbindung von ATP verantwortlich sind. In Abbildung 21b ist die molekulare Oberfläche des Komplexes samt ATP dargestellt. Auffällig dabei ist ein stark positiv geladener Bereich in der Umgebung der α -Phosphatgruppe des ATPs. Dabei handelt es sich um drei Argininreste (Arg-375, Arg-379 und Arg-410), welche mit der α -Phosphatgruppe Wasserstoffbrücken ausbilden. Die ATP-Bindungstasche ist in Abbildung 22 dargestellt. Eine Analyse der hydrophoben und polaren Kontakte der 5'-NT mit ATP wurde mit dem Programm LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) durchgeführt (Abbildung 23). Hierbei stellt sich heraus, daß für die hydrophoben Wechselwirkungen vor allem zwei Phenylalanine (Phe-429 und Phe-498) verantwortlich sind, zwischen denen sich der Adeninring des ATPs befindet. Diese drei aromatischen Gruppen bilden eine typische Stapelwechselwirkung aus. Zusätzlich bildet Gly-407 hydrophobe Kontakte zum Adeninring aus. Die polaren Kontakte bilden neben den drei Argininresten Asn-431, Asp-504 und das Sauerstoffatom der Hauptkette des Gly-458. Das N1-Atom des Adeninringes kann eine Wasserstoffbrücke mit einem Proton an N δ 2 von Asn-431 und die Protonen an den beiden Hydroxylsauerstoffatomen (O2' und O3') der Ribose können Wasserstoffbrücken zu den beiden Sauerstoffatomen (O δ 2 und O δ 1) von Asp-504 ausbilden. Das Sauerstoffatom des Proteinrückgrads von Gly-458 ist in der Lage mit einem Proton am Sauerstoffatom O2 α der α -Phosphatgruppe eine Wasserstoffbrücke auszubilden, falls dieses tatsächlich protoniert vorliegt.

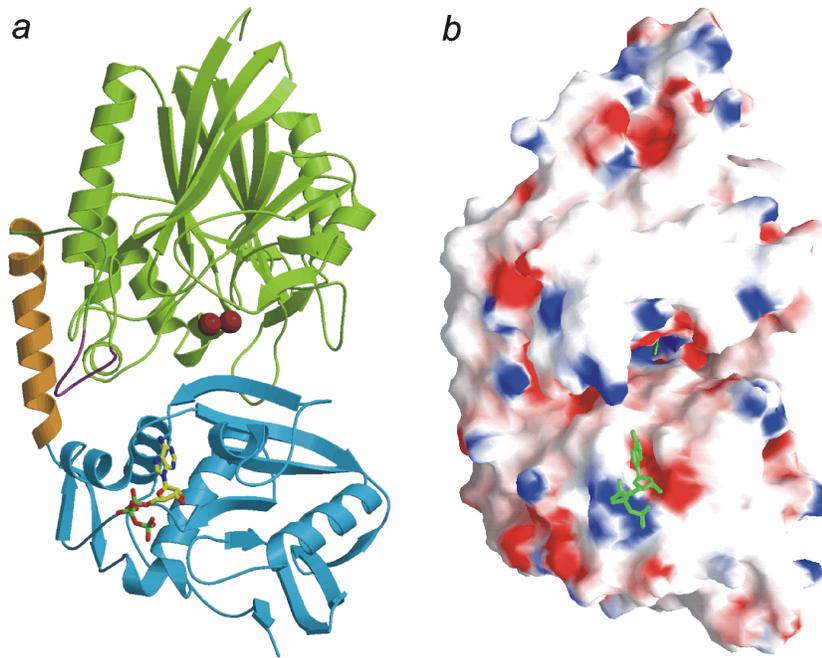


Abbildung 21: Struktur der ATP-Substratkomplexes in der inaktiven Konformation I der 5'-NT. **a**, ATP bindet in einer Bindungstasche der C-terminalen Domäne (blau, N-terminale Domäne ist grün). Das ATP-Molekül ist etwa 20 Å vom katalytischen Zentrum entfernt gebunden (die beiden Zinkionen sind rot dargestellt). **b**, Molekulare Oberfläche. Die Oberfläche ist entsprechend dem elektrostatischen Potential gefärbt (blau für positive und rot für negative Ladung). Drei Argininreste bilden eine Region positiven Potentials in der Umgebung der Phosphatreste des ATP-Moleküls.

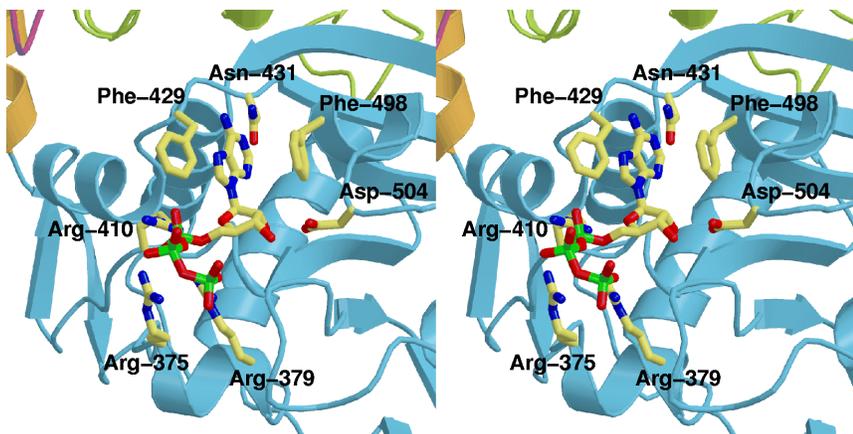


Abbildung 22: Stereoabbildung der ATP-Bindungstasche. Die Orientierung des ATP-Substratkomplexes entspricht der von Abbildung 21. Auch die Farbgebung der Domänen ist entsprechend dieser Darstellung gewählt.

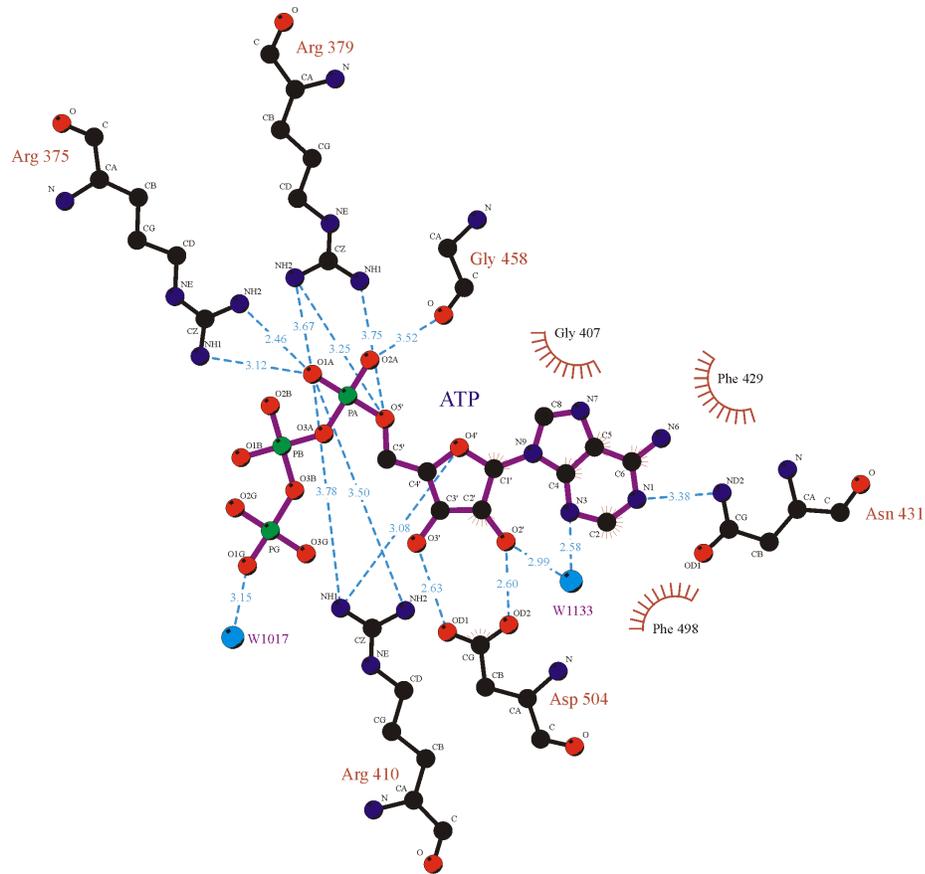


Abbildung 23: Bindungsmodus von ATP in der Bindungstasche der tetragonalen Kristallform I. Eine mit LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) erstellte schematische Darstellung der möglichen hydrophoben (als Sonnen dargestellt) und polaren (blaue gestrichelte Linien mit Bindungsabständen in Å) Wechselwirkungen von ATP mit Resten der spezifischen Bindungstasche. Der Adeninring befindet sich gestapelt zwischen zwei Phenylalaninen. Die α -Phosphatgruppe des ATPs bildet polare Wechselwirkungen mit drei Argininresten der C-terminalen Domäne.

4.5 Diskussion

4.5.1 Ein Vergleich mit anderen 5'-NTs

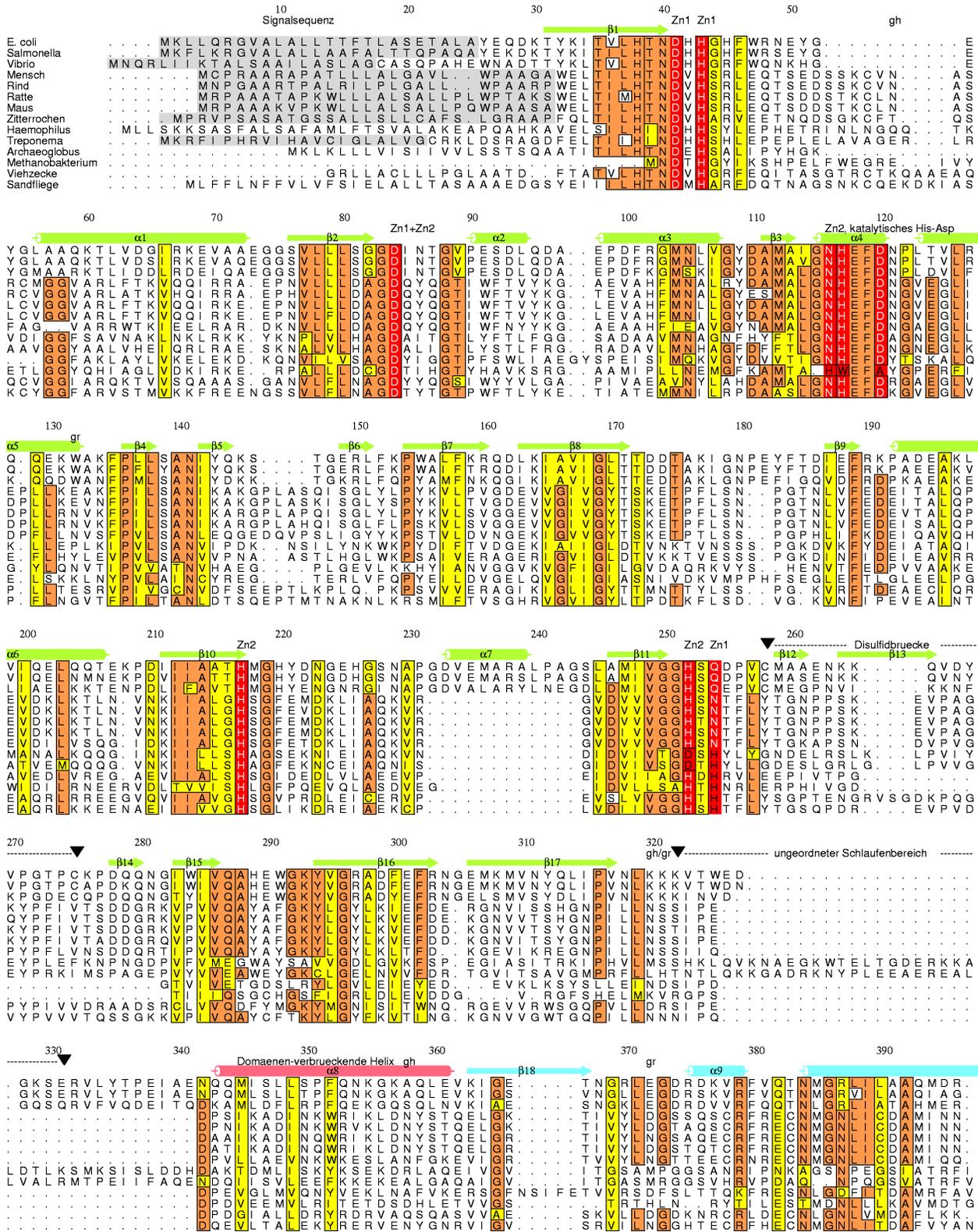
Ein Vergleich der Primärsequenzen verschiedener 5'-Nucleotidasen aus Wirbeltieren und Bakterien offenbart Sequenzidentitäten, die auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen lassen (Volkmandt *et al.*, 1991; Zimmermann, 1992). Obwohl die Identität der *E. coli* Proteinsequenz gegenüber anderen Sequenzen kaum höher als 20 % ist, so finden sich doch verschiedene Bereiche mit deutlich konservierten Aminosäuren. Abbildung 24 zeigt diese konservierten Bereiche, die vor allem Liganden des aktiven Zentrums der 5'-NT oder Aminosäuren von β -Strängen umfassen, die sich im hydrophoben Kernbereich des Enzyms befinden. Die Sequenzhomologie innerhalb der N-terminalen Domäne ist höher als die der C-

terminalen Domäne, aber dennoch sollten beide Domänen, die in der Struktur der 5'-NT von *E. coli* gefunden wurden, zumindest in ähnlicher Form auch in den tierischen und anderen bakteriellen Organismen vorkommen. Alle Deletionen und Insertionen innerhalb des Sequenzvergleiches tierischer und bakterieller 5'-NTs treten hauptsächlich in Lösungsmittelbereich exponierten Proteinschlaufen auf und sollten somit keinen großen Einfluß auf die Faltung der beiden Domänen besitzen. Die tierischen Ecto-5'-NTs unterscheiden sich von den bakteriellen durch die Ausbildung von Homodimeren, die mittels intermolekularer Disulfidbrücken zusammengehalten werden, in der Anwesenheit von sauerstoffgebundenen Glycosylierungsstellen und dem Vorkommen von GPI-Ankern, die den C-Terminus des Enzyms mit der Zellmembran verknüpfen (Zimmerman, 1992). Es existieren vier mögliche Glycosylierungsstellen in der Sequenz der menschlichen 5'-NT und der Sequenz des Zitterrochenes. In dem Sekundärstruktur-unabhängigen Vergleich der Sequenzen in Abbildung 24 liegen alle diese möglichen Glycosylierungsstellen an Oberflächenbereichen des Enzyms, einschließlich einer möglichen Glycosylierungsstelle im Bereich der Helix α_8 , die beide Domänen verbindet. Diese Glycanketten sind wahrscheinlich an nicht-katalytischen Funktionen, wie beispielsweise der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion einiger Ecto-5'-NTs, einschließlich dem humanen CD73, beteiligt.

Sehr gut konserviert sind die Metalliganden des aktiven Zentrums, mit Ausnahme von Gln-254, das in den tierischen 5'-NTs durch ein Asparagin ersetzt ist. In den 5'-Nucleotidasen von *Haemophilus influenza*, *Treponema pallidum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Boophilus microplus* (Viehzecke) und *Lutzomyia longipalpis* (Sandfliege) befindet sich ein Histidin anstelle von Gln-254. Sehr gut konserviert sind auch die Reste des katalytischen His-117/Asp-120-Paares. Die Disulfidbrücke zwischen Cys-258 and Cys-275 existiert in den bakteriellen Enzymen von *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Vibrio parahaemolyticus* aber nicht in denen der anderen Organismen. Neben der Konserviertheit der Reste des aktiven Zentrums ist die Frage nach dem Auftreten der substratbindenden Reste in anderen Aminosäuresequenzen als der von *E. coli* von Interesse. Denn daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Bindung der Substrate und die Struktur der C-terminalen Domäne ziehen, die die spezifische Bindungstasche enthält. Phe-429, eines von den beiden Phenylalaninen zwischen denen sich der Adeninring des Substrates befindet, ist sehr gut konserviert, während Phe-498 oft gegen ein Tyrosin ausgetauscht ist. Der Austausch von Phe gegen Tyr tut dem benötigtem hydrophoben Charakter aber keinen Abbruch, denn auch Tyrosin kann eine hydrophobe Stapelwechselwirkungen mit dem Adeninring eingehen. Des weiteren ist die Konserviertheit der drei phosphatbindenden Arginine zu untersuchen. Arg-375 ist nicht konser-

viert, jedoch die beiden Arginine Arg-379 und Arg-410. Ebenfalls sehr gut konserviert ist Asp-504, welches polare Wechselwirkungen mit den Hydroxylgruppen der Ribose eingeht. Asn-431 dagegen ist in den bakteriellen Enzymen gut konserviert, in den tierischen Organismen allerdings gegen ein Glycin oder Serin ausgetauscht. Die Glycine Gly-407 und Gly-458 kommen sowohl in den bakteriellen als auch in den tierische Enzymsequenzen der 5'-NTs vor. Demnach sind die meisten der substratbindenden Reste sehr gut konserviert, was auf sehr ähnliche Strukturen der einzelnen Substratbindungstaschen schließen läßt.

Die Reste des β -Stranges β 27, der sich in der inaktiven Form des Enzyms in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, sind innerhalb der bakteriellen Sequenzen gut erhalten, allerdings verschieden zu denen aus den tierischen 5'-NTs. Diese Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit der beobachteten Substratbindung. Diese zeigt nämlich, daß sich die spezifische Bindungstasche nicht in der unmittelbaren Umgebung von β 27 befindet, und die sich darin befindenden Aminosäurereste wohl nicht an der Substratbindung beteiligt sind.



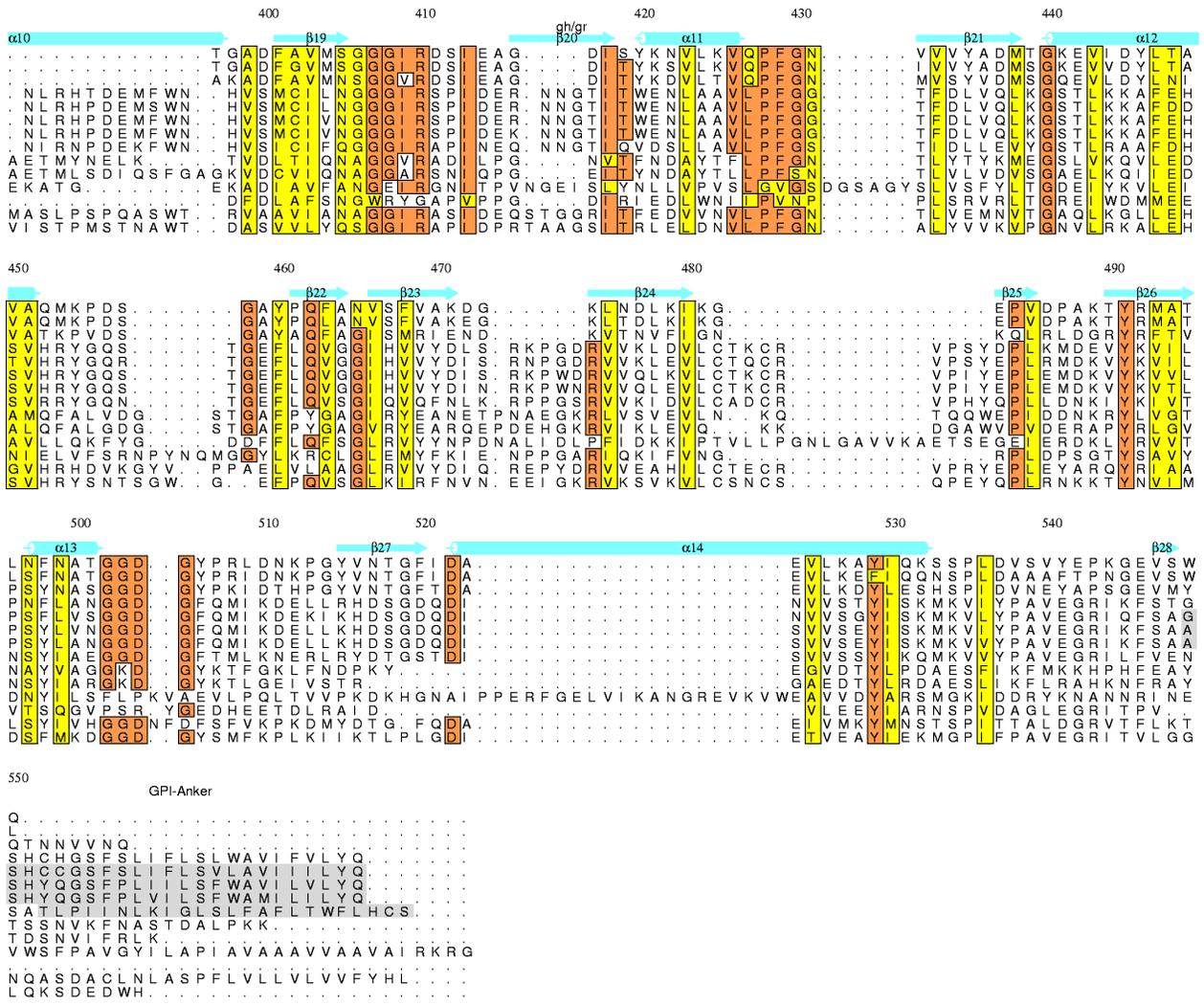


Abbildung 24: Sekundärstruktur-unabhängiger Vergleich von Primärsequenzen verschiedener 5'-NTs aus Wirbeltieren, Bakterien und Insekten. Verglichen werden die 5'-NTs von *E. coli* (P07024), *Salmonella typhimurium* (P06196), *Vibrio parahaemolyticus* (P22848), Mensch (P21589), Rind (Q05927), Ratte (P21588), Maus (Q61503), Zitterrochen (P29240), *Haemophilus influenzae* (P44569), *Treponema pallidum* (O83142), *Archaeoglobus fulgidus* (O29385), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (O27538), Viehzecke (P90696) und Sandfliege (Q9XZ43). Die Numerierung entspricht der *E. coli* Sequenz. Die Sekundärstrukturelemente entstammen der inaktiven Röntgenstruktur der 5'-NT und sind entsprechend der Domänen in Abbildung 15 gefärbt. Homologe Reste sind gelb und identische Reste sind orange unterlegt. Katalytische Aminosäurereste sind rot unterlegt und entsprechend ihrer Metallkoordination mit Zn1 oder Zn2 markiert. Asparaginreste, die potentielle Glycosylierungsstellen der menschlichen 5'-NT Sequenz oder der aus dem Zitterrochen darstellen sind mit gh bzw. gr markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt, und die Abbildung mit dem Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) erzeugt.